



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

## **Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de un gel preparado con extracto etanólico de *Marrubium vulgare L.***

### **TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

### **AUTOR**

**Jimmy LIMAYMANTA GONZALES**

### **ASESOR**

**Julio Reynaldo RUIZ QUIROZ**

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

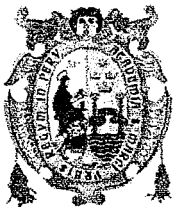
Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Limaymanta J. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de un gel preparado con extracto etanólico de *Marrubium vulgare* L. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2018.

---



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Decanato**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de un gel preparado con extracto etanólico de *Marrubium vulgare* L.

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

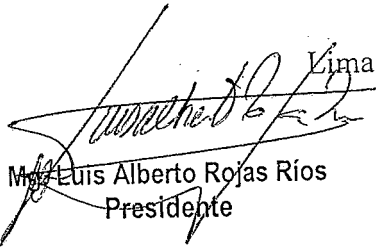
**JIMMY LIMAYMANTA GONZALES**

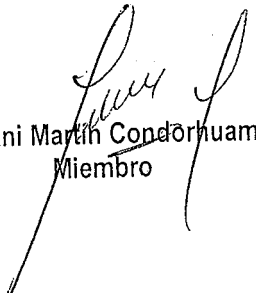
Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

17 (Diecisiete) Sobresaliente

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 30 de noviembre de 2018.

  
Luis Alberto Rojas Ríos  
Presidente

  
Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa  
Miembro

  
Dra. Mirtha Roque Alcarraz  
Miembro

  
Q.F. Denis Alain García Mayta  
Miembro

**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

## **DEDICATORIA**

**A Dios quien bendice mi profesión y mi hogar, gracias por estar con  
nosotros todos estos años.**

**Con mucha gratitud, respeto y amor a mi madre Lilibian Linda Gonzales  
Urcuhuaranga y mi padre Fredy Limaymanta Surichaqui, quienes hicieron el  
enorme sacrificio para poder darle un estudio profesional a su amado hijo y  
por apoyarme en todos los momentos de mi vida.**

## **AGRADECIMIENTO**

**A mi asesor Mg Julio Reynaldo Ruiz Quiroz por su valiosa ayuda incondicional en estos meses, demostrando ser un gran profesional y un modelo a seguir, los futuros químicos farmacéuticos nos sentimos muy agradecidos de tener a un gran maestro en nuestras aulas.**

**A mi jurado examinador y calificador: Mg. Luis Alberto Rojas Ríos, Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa, Dra. Mirtha Roque Alcarraz y Q.F. Denis Alain García Mayta, por enseñarme dentro de las aulas y luego en la realización de la tesis, despertando de cierta manera mi espíritu de investigador.**

**A mi hermano Jhery, quien por medio de sus consejos y apoyo me ayudo a conocer y elegir esta noble profesión y por el apoyo mutuo durante los años de estudio.**

**A mis amigos y amigas de la promoción ingresante 2011 quienes me acompañaron los 6 años de estudios dentro de las aulas y fuera de ellas, años de compañerismo y apoyo fraternal.**

**A mis amigos, alumnos y docentes del laboratorio de Química Inorgánica, quienes formaron mi interés por la ciencia y la química, que hoy por hoy me permite tener un mejor desempeño en mi vida personal y profesional.**

**A Laboratorios Fitogreen SAC por permitirme ser parte de su institución, por educarme en el ámbito personal y profesional, por darme la oportunidad de conocer personas valiosas que hasta el día de hoy me continúan dando valiosos consejos.**

## ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Objetivos.....	3
1.1.1.	Objetivo general .....	3
1.1.2.	Objetivos específicos.....	3
II.	GENERALIDADES .....	4
2.1.	Aspectos botánicos de la especie en estudio .....	4
2.2.	Plantas medicinales .....	9
2.3.	La piel .....	13
2.4.	Geles .....	16
2.5.	Métodos para la evaluación de la concentración mínima inhibitoria y la determinación de la actividad antibacteriana .....	17
III.	PARTE EXPERIMENTAL.....	19
3.1.	Flujograma de trabajo experimental .....	19
3.2.	Materiales .....	20
3.3.	Metodología .....	21
3.3.1.	Tipo de estudio .....	21
3.3.2.	Colección e identificación del material botánico.....	21
3.3.3.	Preparación del extracto del <i>Marrubium vulgare L.</i> .....	22
3.3.4.	Estudio fitoquímico .....	22
3.3.5.	Actividad antibacteriana.....	23
3.3.6.	Formulación del gel base de carbomer .....	27
3.3.7.	Incorporación del extracto seco .....	27
3.3.8.	Evaluación de la actividad antibacteriana del gel con los extractos del tallo y las hojas del <i>Marrubium vulgare L.</i> al 1 %, 2 % y 4 % (P/V) .....	28
IV.	RESULTADOS.....	29
4.1.	Descripción del extracto seco .....	29
4.2.	Marcha fitoquímica.....	30
4.3.	Determinación de la actividad antibacteriana .....	31
4.3.1.	Método de difusión en agar .....	31



4.3.2.	Determinación de la CMI por el método de microdilución colorimétrica en microplaca .....	33
4.4.	Formulación del gel antibacteriano.....	34
4.4.1.	Pruebas de formulación.....	34
4.4.2.	Establecimiento de la formulación .....	34
4.4.3.	Incorporación del extracto seco .....	34
4.4.4.	Características del gel base de carbomer .....	35
4.5.	Determinación de la actividad antibacteriana del gel con la adición de los extractos secos (tallos y hojas) .....	35
V.	DISCUSIÓN .....	37
VI.	CONCLUSIONES.....	41
VII.	RECOMENDACIONES .....	42
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43
IX.	ANEXOS .....	50
9.1.	Certificación de identificación botánica.....	50
9.2.	Fotos del material biológico.....	51
9.3.	Evaluación antibacteriana del extracto seco de tallos y hojas por el método de difusión en agar .....	53
9.4.	Determinación de la CMI por el método de microdilución colorimétrica...59	
9.5.	Evaluación antibacteriana de los controles positivos (trimetropim/ sulfametoxazol 25 µg/disco y ciprofloxacino 5 µg/disco) y negativo (DMSO) por el método de difusión en agar.....	61
9.6.	Elaboración del gel base con el extracto vegetal.....	64
9.7.	Evaluación de la actividad antibacteriana del gel preparado con el extracto seco de tallo y hoja .....	65

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos etanólicos del tallo y las hojas del *Marrubium vulgare* L. (pega pega); así como preparar un gel base al que se le incorporo los extractos que demostraron buenos resultados de inhibición del crecimiento bacteriano. La especie vegetal se recolectó en el departamento de Junín, provincia de Huancayo. El trabajo se desarrolló en 2 etapas: se evaluó la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrica frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633; asimismo se preparó un gel a base de carbomer al que se le agregó el extracto seco y luego se determinó la actividad antibacteriana del gel mediante el método de difusión en agar. El extracto seco del tallo presentó actividad antibacteriana a una concentración de 100 mg/mL (halo de inhibición  $\geq 18$  mm) frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 por el método de difusión en agar, mientras que en el caso del extracto de las hojas presento acción frente a todas las bacterias en estudio excepto para *Escherichia coli* ATCC 25922, por el método de microdilución, el extracto seco de las hojas presentó actividad antibacteriana significativa frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CMI =  $666,67 \pm 243,98$   $\mu\text{g/mL}$ ), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (CMI =  $633,33 \pm 228,87$   $\mu\text{g/mL}$ ) y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CMI =  $300 \pm 103,51$   $\mu\text{g/mL}$ ), mientras que en el caso del tallo se observó un CMI de  $733,33 \pm 238,2$   $\mu\text{g/mL}$  para el *Bacillus subtilis* ATCC 6633. La preparación del gel se realizó en base a la consistencia y estabilidad, al ser incorporado los extractos a las concentraciones de 1 %, 2 % y 4 %, presentado mayor acción antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 al 2 % y 4 % tanto en tallos como en hojas respectivamente.

**Palabras claves:** *Marrubium vulgare* L. (pega pega), actividad antimicrobiana, microdilución colorimétrica, concentración mínima inhibitoria (CMI), gel.

## SUMMARY

The objective of this research was to determine the *in vitro* antimicrobial activity of the ethanolic extracts of the stem and leaves of *Marrubium vulgare* L. (pega pega); as well as preparing a base gel to which the extracts that showed good results of inhibition of bacterial growth were incorporated. The plant species was collected in the department of Junín, province of Huancayo. The work was developed in 2 stages: the antimicrobial activity was evaluated by agar diffusion method and the minimum inhibitory concentration (CMI) was determined by the colorimetric microdilution method against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633; a carbomer-based gel was also prepared to which the dry extract was added and then the antibacterial activity of the gel was determined by the agar diffusion method. The dry extract of the stem showed antibacterial activity at a concentration of 100 mg/mL (inhibition halo  $\geq 18$  mm) against *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 by the agar diffusion method, while in the case of the extract of the leaves I present action against all the bacteria under study except for *Escherichia coli* ATCC 25922, by the microdilution method, the dry extract of the leaves showed significant antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CMI =  $666,67 \pm 243,98$   $\mu\text{g/mL}$ ), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (CMI =  $633,33 \pm 228,87$   $\mu\text{g/mL}$ ) and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CMI =  $300 \pm 103,51$   $\mu\text{g/mL}$ ), while in the case of the stem a CMI of  $733,33 \pm 238,2$   $\mu\text{g/mL}$  was observed for *Bacillus subtilis* ATCC 6633. The preparation of the gel was carried out based on the consistency and stability, when the extracts were incorporated at concentrations of 1%, 2% and 4%, presenting greater antibacterial action against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 at 2 % and 4 % in both stems and leaves respectively.

**Key words:** *Marrubium vulgare* L. (pega pega), antimicrobial activity, colorimetric microdilution, minimum inhibitory concentration (MIC), gel

## I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el uso de productos naturales se ha incrementado especialmente en dolencias para los que no existe un tratamiento adecuado, por lo que es necesario buscar el conocimiento preciso de su composición química y realizar ensayos tanto químico como farmacológico<sup>1</sup>.

Según la OMS, los medicamentos herbarios que contienen como “principios activos”: partes de plantas u otros materiales vegetales, se ha establecido y reconocido su uso como inocuo y eficaz<sup>2</sup>. La medicina herbaria se usa en lugares donde no se tiene acceso a los fármacos sintéticos, se usan desde tiempos remotos para curar o aliviar las enfermedades, dando lugar a los fitofármacos, es apreciada por su bajo costo y por los reducidos índices de toxicidad, en comparación con los productos de síntesis<sup>3</sup>.

Los investigadores y el personal de salud están interesados en el estudio de los extractos vegetales principalmente por 2 razones: en primer lugar, pocas moléculas obtenidas de estos son lanzados al mercado debido a la complejidad para su aislamiento. En segundo lugar, los compuestos vegetales se adquieren fácilmente sin necesidad de prescripción médica, su uso indiscriminado se incrementa al no haber una normativa que regule su seguridad, eficacia y calidad, debido a la idea de “volver a lo natural” o “lo natural no hace daño”<sup>4</sup>. Muy pocos antibióticos derivados de productos naturales son lanzados al mercado cada año, en este sentido, se está incrementado el porcentaje de la inversión en investigación de nuevos fármacos<sup>5</sup>.

Adicionalmente, la tasa de incidencia de resistencia bacteriana es muy alta, entre las bacterias implicadas en este fenómeno creciente son las bacterias Gram positivos como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp* coagulasa negativa, *Enterococcus sp*, etc y los Gram negativos: Enterobacterias y bacterias no fermentadoras, principalmente debido a los antibióticos que son usados indiscriminadamente en infecciones comunes adquiridas en la comunidad, por lo que se ha convertido en un grave problema de la salud pública afirmado por la OMS, la Organización Panamericana de la Salud y los Ministerios de Salud de

distintas naciones, dicha situación se agrava debido a la poca incorporación de nuevos agentes antimicrobianos al mercado, así que se recurre al reino vegetal por ser una potencial fuente de nuevos agentes antimicrobianos<sup>6,7,8,9</sup>.

Durante los años 70, la Organización Mundial de la Salud (OMS) tomó la iniciativa de abogar por la integración de la medicina tradicional en los programas de salud pública en países del tercer mundo. Este esfuerzo culminó en la Declaración de Alma Ata de 1978 que proclamó “Salud para todos en el año 2000”<sup>10</sup>. En la actualidad los gobiernos aun buscan incluir a los productos naturales y sus derivados en el servicio de salud pública para buscar promover su seguridad, eficacia y calidad<sup>11</sup>.

Durante los últimos años se ha visto el crecimiento del comercio de los fitomedicamentos. A fines del siglo XX el mercado norteamericano y el europeo alcanzaron cifras cerca de los 7 y 5 billones de dólares en ventas respectivamente<sup>12</sup>. El incremento de su venta se debe principalmente a la opinión generalizada de que los productos naturales no presentan efectos colaterales; sin embargo, estos no pueden ser clasificados como inocuos<sup>13</sup>.

El Perú, con 84 de las 107 ecorregiones, posee una gran biodiversidad en flora y fauna, se ha estimado que cuenta con 7 % de todas las plantas del mundo, de las cuales solo se ha estudiado el 60 % habiéndose encontrado 1400 especies de uso medicinal. El Perú, al igual que los demás países en vías de desarrollo, tienen en sus plantas su principal herramienta para sus tratamientos médicos<sup>14</sup>.

Esta investigación se realizó porque existe la necesidad de demostrar científicamente el conocimiento ancestral acerca de la actividad antibacteriana del *Marrubium vulgare* L., de este modo poder obtener nuevas alternativas para combatir las infecciones cutáneas, los cuales pueden ser muy efectivos en países subdesarrollados con poco acceso a los medicamentos, lo que también implica un menor gasto en la salud pública. Adicionalmente, un problema de salud grave es la resistencia bacteriana a los antibióticos por lo tanto es de gran importancia poder encontrar otras alternativas como los extractos vegetales que podrían superar los mecanismos de resistencia antibacteriana.

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo general:**

- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de un gel preparado con el extracto etanólico del tallo y de las hojas del *Marrubium vulgare* L.

### **1.1.2. Objetivos específicos:**

1. Evaluar la actividad antibacteriana del extracto del tallo y de las hojas del *Marrubium vulgare* L. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922.
2. Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto del tallo y de las hojas del *Marrubium vulgare* L. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922.
3. Evaluar la actividad antibacteriana del gel preparado con diversas concentraciones del extracto etanólico del tallo y de las hojas del *Marrubium vulgare* L. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

## **II. GENERALIDADES**

### **2.1. Aspectos botánicos de la especie en estudio**

#### **Familia Lamiaceae**

Son generalmente hierbas perennes y plantas arbustivas, rara vez enredaderas e incluso árboles de tallos aéreos de sección cuadrangular, raramente subterráneos: estoloníferos o tuberculados. Las hojas son habitualmente opuestas, decusadas, a veces más de dos por verticilo, simples, de lineares a anchamente ovadas, enteras, serradas, dentadas y lobuladas. Las inflorescencias se organizan en cimas formadas por verticilastros bi o multiflorales, con flores sentadas o pediceladas. Las flores, generalmente pentámeras, son hermafroditas, con cáliz actinomorfo o zigomorfo, con 5 sépalos soldados en su mayoría. La corola, de 5 pétalos soldados, es usualmente bilabiada, pero también puede ser unilabiada. El fruto es un esquizocarpo, rodeado del cáliz persistente, formado por 4 núculas secas e indehiscentes, con o sin endosperma, de las que a menudo, no maduran todas. Menos corriente son los frutos en núculas drupáceas, con exocarpo espeso y carnoso y endocarpo coriáceo<sup>15</sup>.

#### **Genero *Marrubium***

El género *Marrubium* posee 40 especies conocidas, de los cuales 25 han recibido especial atención científica, en este sentido se logró aislar e identificar 150 sustancias diferentes y evaluar sus propiedades biológicas. Son plantas perennes, algo leñosas en la base con tallos con indumento denso, de grisáceo a blanquecino, formado por pelos simples y compuestos. Hojas pecioladas, ovadas, orbiculares, subtriangulares o flabeliformes, de dentadas a lobuladas, con nervadura marcada y con indumento denso, tomentoso. Inflorescencia en verticilastros separados, orbiculares. Cáliz tubular, con 5 a 10 dientes, rectos o uncinados, espinescentes, corola con labio superior bífido, erecto, e inferior trilobulado, estigma bífido, inserto. Núculas elipsoides, negruzcas<sup>16</sup>.

Se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo, principalmente en regiones cálidas y templadas de Europa, África y Asia. En Sudamérica se encuentra

en el área de sabanas en Brasil, la pampa en Argentina, entre otros<sup>17</sup>. Una revisión de la literatura sobre los aspectos químicos y biológicos de estas plantas indica la presencia de actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, propiedades analgésicas, antihipertensivas, antidiabéticas, antioxidantes, entre otras, particularmente relacionados con la presencia de diterpenos, esteroides, fenilpropanoides y flavonoides<sup>18</sup>.

- **Clasificación taxonómica:**

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Marrubium*

Especie: *Marrubium vulgare* L.

**Nombres comunes:** Cordón de muerto, marrubio, coronilla, pega pega, ortiga chilena, nacnac, marrubio blanco, malvarrubia, etc<sup>19, 20</sup>.

**Descripción:** Es una hierba perenne cuya altura puede oscilar dependiendo la ubicación geográfica, en el Perú alcanza 1 metro de altura, mientras que en Brasil y el Mediterráneo llega a 50 y 80 cm respectivamente, con tallos robustos, erectos de sección cuadrangular, huecos de 3 a 5 mm de diámetro, con ramas ascendentes, obtusamente tetragonales y recubiertos con una densa pilosidad, posee hojas opuestas: las inferiores largamente pecioladas y grandes mientras que las superiores cortamente pecioladas y más pequeñas. Los limbos, son verde grisáceo por el haz y blanquecinos por el envés. Sus flores son pequeñas, de colores blancos sésiles y subsésiles dispuestos en verticilos. Son bilabiadas con un labio superior plano y uno inferior trilobado (**Figura 1**)<sup>19</sup>.





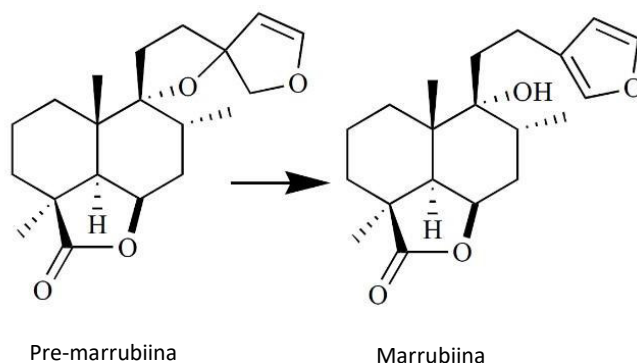
**Figura 1.** *Marrubium vulgare* L.

**Distribución geográfica:** De origen africano, adventicio en casi todo el mundo. En Perú se encuentra distribuido en los departamentos de: Cajamarca, La Libertad, Ancash, Junín y Arequipa<sup>20</sup>.

**Usos de la especie:** Las partes aéreas son ampliamente utilizados en la medicina popular por su actividad hipoglucémica, antihipertensivo, analgésica, anticancerígeno, antiedematoso, expectorante, insecticida entre otros<sup>21</sup>. Su uso tradicional en el lugar de recolección es antibacteriano, este se realiza por cocción de las partes aéreas (tallos, hojas y flores), posteriormente se realiza el lavado de la zona afectada.

La composición fitoquímica es muy variada y compleja tanto en su extracto como en su aceite esencial. Su sabor amargo se debe a su principal compuesto extraído de las sumidades floridas: la marrubiina, una lactona diterpenica amarga de un núcleo labdanofuranico, esta se forma por transformación de un precursor inestable (pre-marrubiina) **(Figura 2)**<sup>22</sup>. También presenta otros compuestos como flavonoides, lactatos de flavonoides, diterpenoides, ésteres de fenilpropanoide, antocianinas, aceites esenciales, ácidos fenólicos, taninos, saponinas, mucilagos, alcaloides, cumarinas, materiales minerales (sales de potasio y hierro) y vitamina C<sup>19</sup>.

El aceite esencial está formado principalmente por  $\alpha$ -Pineno (28,85 %),  $\beta$ -Pineno (18,31 %),  $\beta$ -felandreno (17,40 %) y 2- hexenal (14,80 %) <sup>23</sup>.



**Figura 2.** Bio-transformación de marrubiina a partir de la pre-marrubiina<sup>22</sup>.

En un estudio realizado en Argentina se demostró su propiedad antiinflamatoria en ratones usando el extracto etanólico de las partes aéreas desecadas. El extracto etanólico (5 g en 200 mL de solvente y reconstituido en 2.5 mL de vehículo) inhibió el edema en un 49 % respecto al grupo control<sup>24</sup>.

En un estudio preliminar se demostró que el extracto metanólico de *Marrubium vulgare* L. presenta actividad insecticida en larvas de gusano egipcio (*Spodoptera littoralis*), afectando significativamente los índices de crecimiento [tasa de crecimiento relativa (RGR), eficiencia de conversión de alimentos ingeridos (ECI) y eficiencia de conversión de alimento digerido (ECD)] <sup>25</sup>.

Ahmad, *et al.* han encontrado actividad antihepatotóxica en diferentes extractos de *Marrubium vulgare* L. (éter de petróleo, cloroformo y metanol) reduciendo los niveles de enzimas séricas tales como el aspartato aminotransferasa (GOT), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (PA) y aumento de la proteína total (TP) indicando que el extracto metanólico fue más activo en comparación con el fármaco estándar: “silimarina” <sup>26</sup>.

En un estudio realizado en Iran, se evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico y el aceite esencial del *Marrubium vulgare* L. por el método de microdilución frente al *Staphylococcus aureus*. El aceite esencial se obtuvo por

destilación usando el aparato Clevenger y el extracto se preparó usando 60 mL de etanol 95° por cada 20 gramos de material seco y molido. Se usaron concentraciones de 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62 y 0.3 mg/mL. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto fue de 2,5 y 5 mg/mL mientras que del aceite esencial fue de 1,25 y 5 mg/mL respectivamente. El estudio no revela diferencia significativa entre la actividad del extracto y el aceite esencial<sup>27</sup>.

En un estudio realizado en Túnez se evaluó la actividad citotóxica del aceite esencial del *Marrubium vulgare* L. frente a líneas celulares HeLa usando el ensayo MTT modificado. Se destiló el aceite esencial por hidrodestilación por 4 horas en aparato tipo Clevenger y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El estudio reveló capacidad de inhibición del aceite esencial en la proliferación de las líneas celulares HeLa a una concentración de 0.258 µg/mL a un valor IC<sub>50</sub>. Dicha actividad puede deberse a la presencia de algunos monoterpenos y sesquiterpenos que incluyen α-Humulene e isoprenoides incluyendo geraniol<sup>28</sup>.

## 2.2. Plantas medicinales

Los usos de las plantas medicinales no necesariamente están exentos de eventos adversos atribuibles a la calidad, seguridad, uso inadecuado y seguridad. En este contexto la OMS elaboro guías sobre la vigilancia de la seguridad de los medicamentos herbarios en los sistemas de farmacovigilancia<sup>29</sup>.

Por lo general los consumidores ignoran cualquier asociación entre el uso de medicamentos a bases de hierbas y reacciones adversas lo que dificulta la notificación de la misma<sup>30, 31</sup>. Otra dificultad también es la falta de información respecto a la composición química y toxicología de las hierbas, es por esto que muchos países de la región están desarrollando programas para promover su uso seguro, reportando casos de toxicidad usando la Guidelines for herbal ATC classification the WHO Collaborating Centre for International Drug Monitoring<sup>32</sup>.

Hoy en día se hace uso de las especies vegetales en el intento de descubrir nuevas alternativas terapéuticas para diversas enfermedades, entre ellas el cáncer. En la actualidad se conocen diferentes ensayos capaces de detectar los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones, con dichos ensayos se realiza con mayor exactitud y rapidez los estudios citotóxicos que permiten el aislamiento de nuevos fitofármacos<sup>33</sup>.

Se estima que las plantas producen más de cien mil metabolitos secundarios, parte de estos brindan una defensa natural frente al ataque de microorganismos, insectos y otros animales. Las razones de ser de estos compuestos se desconocen por el momento, no se sabe a ciencia cierta si realizan diferentes funciones y de manera accidental presentan un poder antimicrobiano, o realmente tienen una actividad antimicrobiana como primer fin<sup>34</sup>.

Estos metabolitos se pueden dividir en 2 grandes grupos: fitoanticipinas y fitoalexinas. Las fitoanticipinas se encuentran *per se* en la planta mientras que las fitoalexinas se producen como una respuesta a la invasión microbiana. Sin embargo, esta definición no es del todo verdadero, puesto que algunos compuestos pueden ser fitoanticipinas en unas y fitoalexinas en otras<sup>35</sup>.

Los microorganismos presentan compuestos anfipáticos que actúan como bombas de expulsión, repeliendo el ingreso de las moléculas a través de la pared bacteriana. También cabe mencionar que las bacterias Gram (+) poseen una pared más accesible y sus bombas de expulsión tiene menos acción comparada con las bacterias Gram (-) y hongos<sup>36</sup>.

El reino vegetal ofrece grandes posibilidades para descubrir nuevos compuestos que podrían servir como un buen candidato para el desarrollo de agentes antimicrobianos y/o fitomedicamentos estandarizados<sup>38</sup>. Los extractos vegetales son capaces de burlar los mecanismos de resistencia debido a su uso limitado en comparación con los antibacterianos tradicionales<sup>39</sup>.

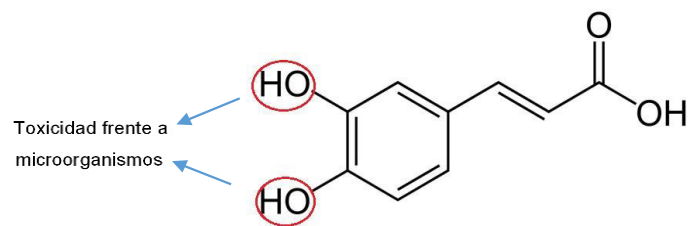
El mecanismo de acción de los metabolitos, aun no se han determinado exactamente, algunas hipótesis dadas son estas: interacción de los compuestos fenólicos con las proteínas de membrana (unión hidrofóbicas y puentes de hidrógeno), inhibición de las enzimas incrustadas en la membrana, la destrucción del sistema de transporte de electrones, la perturbación de la pared celular (formación de complejos), formación de puentes disulfuros con las proteínas, etc<sup>38</sup>.

La actividad biológica puede provenir de cualquiera de sus partes (hojas, tallos, raíces, flores o semillas) que producen sustancias químicas llamadas metabolitos secundarios o principios activos<sup>40</sup>.

Los principales grupos de compuestos generados por las plantas que poseen actividad antibacteriana son los siguientes<sup>41</sup>:

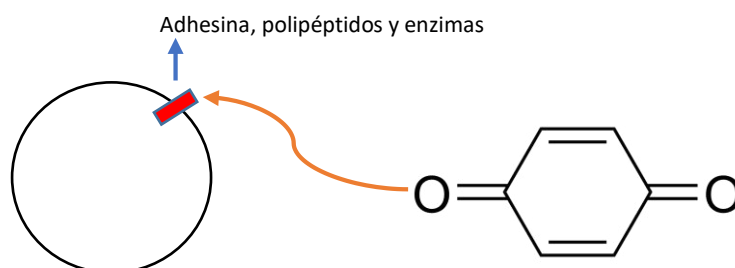
### **Fenoles y heterósidos fenólicos**

- a. Compuestos fenólicos simples.** Son compuestos que consisten de un anillo fenólico sustituido, su acción antibacteriana está relacionada con sus grupos hidroxilos por lo que causa una inhibición enzimática por los compuestos oxidados, mediante reacciones con grupos sulfhidrilo o por interacción no específicas con proteínas (**Figura 3**).



**Figura 3.** Relación estructura-actividad de los flavonoides<sup>41</sup>.

**b. Quinonas.** Son compuestos que consisten en anillos aromáticos con 2 funciones ceto, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, inactivando a este y anulando su función (**Figura 4**).



**Figura 4.** Mecanismo de acción de las quinonas<sup>41</sup>.

**c. Taninos.** Son compuestos fenólicos poliméricos capaces de formar complejos con las proteínas de la membrana e inhibe enzimas, privando del sustrato a las células, destruyendo la membrana, etc.

**d. Cumarinas.** Son compuestos derivados de la benzo- $\alpha$ -pirona (fusión de anillos bencénicos y pirona), su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el ADN eucariota por lo que también se le atribuye actividad antiviral.

**e. Flavonas y compuestos relacionados.** Son estructuras fenólicas que contiene un grupo carbonilo, su actividad antimicrobiana se debe a que forman complejos con las proteínas extracelulares y con la pared bacteriana de forma similar a las quinonas.

**Alcaloides.** Son compuestos nitrogenados heterocíclicos, su mecanismo de acción parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo.

**Polipéptidos.** Son moléculas de gran tamaño constituido por aminoácidos, su mecanismo de acción se puede deber a la formación de canales iónicos en la membrana bacteriana o la inhibición competitiva de la adhesión de las proteínas de los microorganismos en los receptores de polisacáridos del huésped.

## 2.3. La piel

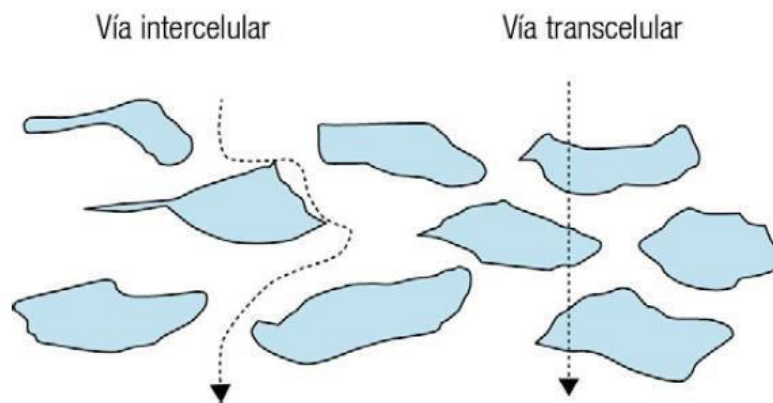
### Morfología y fisiología

La piel constituye el 10 % de la masa corporal y tiene una superficie aproximada de 1,8 m<sup>2</sup>. En cuanto a su estructura, la conforman 3 capas: epidermis, dermis e hipodermis o tejido subcutáneo. La epidermis (150 µm de espesor) consta de 5 subcapas (*stratum corneum*, *stratum lucidum*, *stratum granulosum*, *stratum spinosum* y *stratum germinativum*), en esta capa se encuentran los melanocitos que producen melanina, el cual protege la piel de las radiaciones y las células de Langerhans, responsable de la respuesta inmunológica de la piel. La dermis (3 a 5 mm de espesor) constituido por tejido conectivo con fibras de elastina, colágeno y reticulina brindando propiedades de elasticidad y resistencia a la deformación. El tejido subcutáneo o hipodermis es la capa más profunda formada por tejido adiposo. Entre los apéndices de la piel tenemos: folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas<sup>42</sup>.

Debido a su característica cobertura/envoltura externa está expuesta a traumatismo e infecciones. Se le atribuye varias funciones como: regulación de la temperatura corporal, el mantenimiento del equilibrio hidroeléctrico, la absorción de la radiación ultravioleta, la captación de las señales sensitivas, entre otros<sup>43</sup>.

Dentro de las múltiples funciones de la piel, se destacan especialmente dos: evitar la pérdida de agua y fluidos corporales, así como evitar la entrada de agentes externos. Siendo esta última la propiedad que evita el ingreso de agentes exógenos; sin embargo, hay 3 vías por la que una molécula puede atravesar la piel: por los dominios lipídicos intercelulares, vía transcelular y vía apéndices. La penetración de los fármacos se da a través de la capa cornea vía intercelular y transcelular (**Figura 5**). La piel ya no solo es considerada una zona de aplicación de agentes terapéuticos de acción local. Actualmente cumple dos objetivos: lograr efecto local y efecto sistémico. Algunos fármacos se metabolizan en la piel debido a la presencia de enzimas como esterasas, peptidasas, aminopeptidasas, entre otras<sup>44</sup>.





**Figura 5.** Penetración de fármacos a través de la capa córnea vía intercelular y transcelular<sup>44</sup>.

## Patologías

Las infecciones dérmicas son causadas generalmente por un solo germen, las que se producen en la dermis superficial se deben principalmente al estreptococo grupo A. La alta incidencia de bacterias radica en *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva y *Streptococcus pyogenes* grupo A. Estas dos bacterias son las de mayor presencia en la piel y partes blandas en caso de patologías dérmicas, por ejemplo, el *Staphylococcus aureus* alcanza un 70 – 90 % de la piel en pacientes con dermatitis tóxica<sup>45</sup>.

Otras bacterias que también producen infecciones cutáneas, pero con menor frecuencia son *Streptococcus agalactiae*, bacilos Gram negativos, *Clostridium* u otros anaeróbicos, etc. En ciertas circunstancias la infección puede ser polibacteriana<sup>46</sup>.

Entre las principales infecciones cutáneas tenemos:

- **Impétigo.** Es una infección de la epidermis se asocia a la pobre higiene y hacinamiento, su incidencia es más frecuente en niños de 2 a 5 años de edad. Son lesiones vesiculopustulosas, se le atribuye a *Staphylococcus aureus* productora de una toxina exfoliativa que actúa a nivel intraepidérmico<sup>47</sup>.

- **Ectima.** Es una infección local, pero más profunda, alcanzado la dermis, se presenta en forma diseminada en inmunodeprimidos. La lesión es una vesícula con base eritematosa y penetran a la dermis para formar una ulcera costrosa con bordes elevados. La bacteria responsable es *Streptococcus pyogenes* aunque el *Staphylococcus aureus* se ha aislado en múltiples ocasiones. También se puede producirse por *Pseudomonas aeruginosa*<sup>48</sup>.
- **Síndrome de la piel escaldada.** Es una infección sistémica producido por la diseminación sistemática de las toxinas exfoliativas A y B de *Staphylococcus aureus*, acompañado con lesiones ampollosas dérmicas, descamación cutánea, etc<sup>48</sup>.
- **Celulitis.** Inflamación de la dermis y TCS que se caracteriza por edema, eritema y dolor de la zona afectada. Los microorganismos más frecuentes implicados son *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*, aunque en ciertas circunstancias también es producidas por neumococo, *Salmonella* o enterobacterias<sup>48</sup>.

Entre las principales infecciones cutáneas tenemos:

**Tabla 1.** Principales infecciones cutáneas según localización.

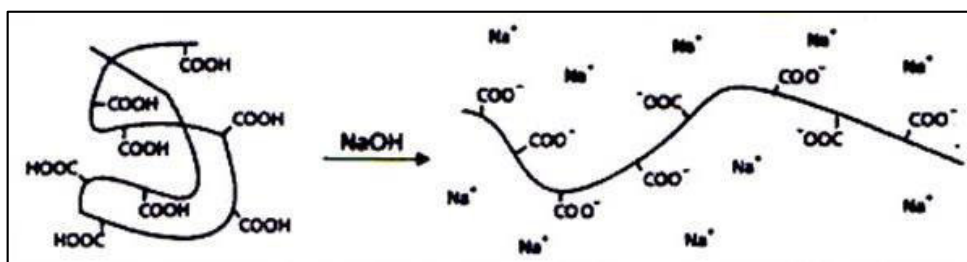
Tipo de infección	Localización
<b>Impétigo</b>	Epidermis
<b>Ectima</b>	Epidermis y dermis
<b>Foliculitis</b>	Folículo piloso-superficial
<b>Forúnculo, ántrax</b>	Folículo piloso-profundo
<b>Hidrosadenitis</b>	Folículo pilosebáceo glándulas apocrinas
<b>Erisipela</b>	Dermis-TCS
<b>Celulitis</b>	Dermis-TCS (más profunda)
<b>Fascitis necrotizante</b>	Fascia profunda
<b>(Pio) Miositis</b>	Músculo
<b>Linfangitis</b>	Vaso linfático
<b>Paroniquia</b>	Absceso superficial

## 2.4. Geles

Son sistemas dispersos compuestos por un polímero gelificante (fase dispersa) y un solvente (fase continua), dichos sistemas pueden requerir una base neutralizante o un acidificante, el cual influye en su estructura tridimensional (**Figura 6**), la característica más importante es la presencia de una estructura continua. Así como las demás formas farmacéuticas los geles también presentan ventajas, pero muy reducidas: son bien tolerados y fácilmente lavables, tienen propiedades emulgentes, dan lugar a formación de películas y producen frescor por lo que su uso se da principalmente en tratamientos superficiales<sup>49</sup>.

Para el caso de los hidrogeles, el hinchamiento es debido a la presencia de grupos polares en su estructura dando como resultado: materiales blandos y elásticos con capacidad de retener agua. Se unen mediante atracción como fuerzas de Van Der Waals, puentes de hidrogeno y enlaces covalentes. Existen redes entrecruzadas que son estables, unidas por enlaces covalentes, pero posee un grado de saturación de agua mientras que las redes no entrecruzadas unidas por enlaces tipo físico que se hinchan sin límite y llegan a disolverse por la entrada progresiva de agua<sup>50</sup>.

Dichos geles pueden sufrir un fenómeno de deshidratación llamado *sinéresis* debido a la contracción de la mismo ocasionando por la cristalización o la formación de nuevos puntos de contactos entre los segmentos del polímero, asimismo también se puede ver afectado por la incorporación de sales<sup>51</sup>.



**Figura 6.** Neutralización del polímero de carbomer con NaOH<sup>49</sup>.

## 2.5. Métodos para la evaluación de la concentración mínima inhibitoria y la determinación de la actividad antibacteriana

Los mecanismos de acción ni los métodos para la determinación de la actividad antimicrobiana o la concentración mínima inhibitoria de los extractos vegetales están definidos del todo, debido a que este se puede ver afectado por diferentes factores tales como el origen del extracto vegetal, el volumen del inóculo, la fase del crecimiento del microorganismo, tiempo de incubación, temperatura, pH, actividad de agua entre otras<sup>52</sup>. Por ello se toman como válidas los siguientes métodos <sup>51</sup>.

- **Métodos para determinar la concentración mínima inhibitoria**

- **Lectura visual:** Se compara de manera visual con el grupo control, se considera la concentración mínima inhibitoria a la concentración que no presenta turbidez. Para comprobar se toma alícuotas de los tubos o pocillo sin turbidez y se hace un estriado en agar.
- **Lectura colorimétrica:** Se usa un indicador oxido-reducción (resazurina), tomando como la concentración mínima inhibitoria a la concentración más baja del extracto donde no hubo cambio de color azul (indicando que no hubo crecimiento).
- **Lectura espectrofotométrica:** Se realiza la lectura a una longitud de onda de 530 nm, agitando por pipeteo para homogenizar. El % de crecimiento se calcula mediante la siguiente formula:

$$\%Crecimiento = \frac{(OD_{muestra} - OD_{blanco})}{(OD_{control} - OD_{blanco})} \times 100$$

Se considera la CMI<sub>50</sub> a la concentración que inhibe el crecimiento en un 50 %.

- **Métodos para determinar la actividad antimicrobiana**

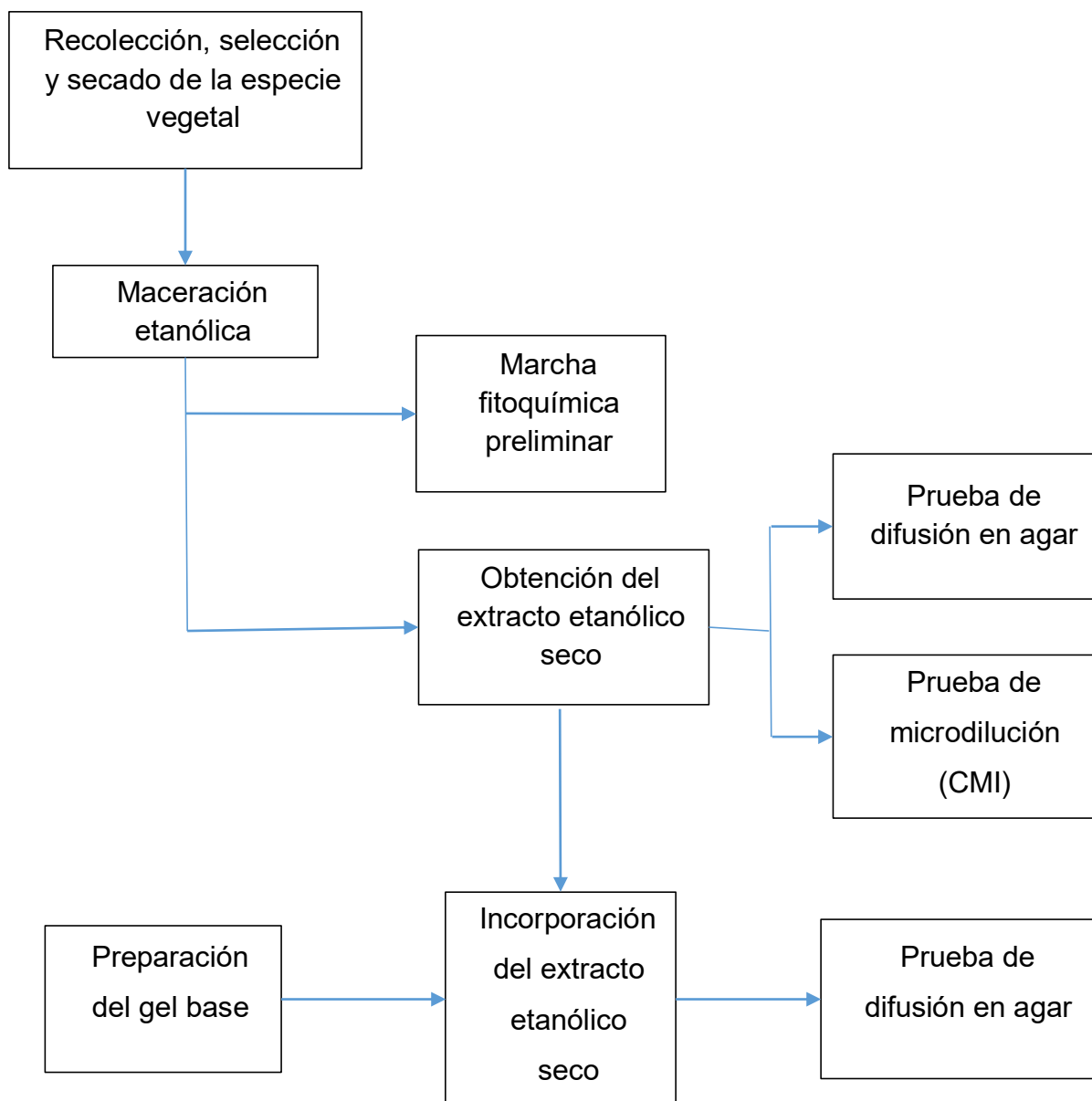
- **Método Kirby Bauer:** Consiste en realizar un frotis de un microorganismo sobre la superficie de un agar sólido, posteriormente se coloca discos de papel filtro embebido con la sustancia a analizar, se procede a incubar y se mide el halo de inhibición incluyendo el diámetro del disco.

- **Método de difusión en agar en pozos:** Consiste en realizar un frotis de un microorganismo sobre la superficie de un agar seleccionado, se realiza un pozo en el agar y se coloca la sustancia a analizar, se procede a incubar. La lectura se realiza de igual forma que el método Kirby Bauer.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

Se definió una metodología para la obtención del extracto, la actividad antibacteriana del mismo, la incorporación de este a el gel y probar la acción de este. Se presenta a continuación.

#### 3.1. Flujograma de trabajo experimental



**Figura 7.** Diagrama de flujo de la parte experimental de la determinación de la actividad antimicrobiana del *Marrubium vulgare* L.

### 3.2. Materiales

#### Material vegetal

- *Marrubium vulgare* L.

#### Material biológico

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

#### Equipos

- Autoclave (Chincan LDZX-50KBS), balanza analítica (Sartorius CPA224S), estufa (Memmert), refrigeradora (Bosch), incubadora (INCUCCELL), molino de cuchillas (Standard Model NOS – Wiley Mill), rotavapor (BUCHI), pH-metro (pH-Checker) y Baño Maria (Memmert).

#### Reactivos

- Etanol Q.P. (Merck, Alemania), dimetilsulfóxido (Merck, Alemania), resazurina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), ciprofloxacino (Merck, Alemania), discos de trimetopim – sulfametoxazol 25 µg/disco (Thermo Fisher Scientific, España), discos de ciprofloxacino 5 µg/disco (Thermo Fisher Scientific, España), agua destilada (Merck, Alemania), cloruro de sodio (Merck, Alemania), carbomer 940 (Merck, Alemania) y glicerina USP (Merck, Alemania).

## **Medios de cultivo**

- Agar Mueller Hinton (Merck, Alemania), agar tripticasa soya (TSA) (Merck, Alemania), caldo Mueller Hinton (Merck, Alemania) y caldo tripticasa soya (TSB) (Merck, Alemania).

### **3.3. Metodología**

#### **3.3.1. Tipo de estudio**

El estudio es experimental porque se hace uso de una variable independiente para modificar una variable dependiente y transversal porque medimos la exposición y si tiene alguna acción sobre el sujeto.

**Variable independiente:** El gel preparado con el extracto etanólico del *Marrubium vulgare* L.

**Variable dependiente:** Actividad antibacteriana *in vitro*.

#### **3.3.2. Colección e identificación del material botánico**

Las partes aéreas de la planta madura se recolectaron en setiembre del 2017, en el distrito de Viques, provincia de Huancayo, departamento de Junín, a una altura de 3195 msnm, la identificación y clasificación taxonómica de la especie vegetal fue realizada por el biólogo José Campos de la Cruz, consultor botánico.

Se recolectó 5 Kg de las partes aéreas (entre tallos y hojas) de la especie vegetal con características homogéneas y libres de daño físico, se procedió a lavar y luego a escurrir, se separó tallos de hojas. El secado se realizó a temperatura ambiente en un lugar ventilado durante 24 horas y luego se llevó a una estufa a 40° C durante 48 horas, posteriormente se llevó a un molino para la reducción de tamaño de partícula.



### **3.3.3. Preparación del extracto del *Marrubium vulgare* L.**

Se realizó la extracción por maceración de las hojas y los tallos por separado, con la finalidad de demostrar las diferencias entre sus metabolitos activos y la actividad antibacteriana, se usó 10 g de material seco por cada 90 mL de etanol QP durante 7 días con agitación constante en un envase de vidrio ámbar. Pasado este tiempo se filtró con papel de filtro Whatman, el solvente se evaporó a sequedad usando un rotavapor a una temperatura que no supere los 40° C, los extractos secos se almacenaron a 8° C<sup>54</sup>.

### **3.3.4. Estudio fitoquímico**

#### **3.3.4.1. Ensayo de solubilidad**

Se colocaron en tubos de ensayo 25, 50, 100 y 200 mg de cada extracto seco y se le agregó los solventes respectivos: agua, etanol 96, etanol-agua (1:1) y DMSO c.s.p. 1 mL.

#### **3.3.4.2. Marcha fitoquímica preliminar de los extractos**

Se preparó una solución acuosa al 5 % a partir del extracto seco de los tallos y de hojas y se procedió a realizar un screening fitoquímico de los principales constituyentes de la planta como son: taninos, flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, aminoácidos libres, saponinas, carbohidratos, glicósidos y triterpenos, etc. Según la técnica descrita por Lock de Ugaz<sup>55</sup>.

### **3.3.5. Actividad antibacteriana**

#### **3.3.5.1. Método de difusión en agar<sup>56</sup>**

##### **a) Microorganismos de estudio**

Para determinar la actividad antibacteriana se utilizaron las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922 del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Química, Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

##### **b) Preparación de la suspensión del inóculo**

Se sembraron las bacterias en estudio en una placa de agar tripticasa soya (TSA) y se incubaron a 37° C durante 24 horas. Para preparar el inóculo se resuspendieron los microorganismos en solución salina estéril al 0,9 % y se ajustó a la turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ( $1 - 1,5 \times 10^8$  UFC/mL)<sup>57</sup>.

##### **c) Preparación de las placas**

El medio de cultivo empleado fue agar Mueller Hinton, previamente esterilizado en autoclave a 121° C durante 15 min, enfriado y mantenido a 45° C, posteriormente se adiciono 1 mL de suspensión del inóculo por cada 100 mL de medio de cultivo, se agito suavemente para homogeneizar y se repartió 25 mL uniformemente en cada placa de Petri, luego se dejó solidificar y se rotuló cada placa. Posteriormente se realizó pozos excavados en el mismo medio de cultivo, con la ayuda de un sacabocado de acero de 10 mm de diámetro externo, distribuidos equitativamente en el interior de cada placa.

#### **d) Preparación de la solución stock de la muestra**

Se preparó una solución de 200 mg/mL del extracto seco del tallo y hojas usando como solvente dimetilsulfoxido (DMSO). Seguidamente se realizó diluciones a 25, 50 y 100 mg/mL. Se usó como control negativo DMSO y como control positivo ciprofloxacino 5 µg/disco y trimetoprim/sulfametoxazol 25 µg/disco.

#### **e) Inoculación e incubación**

Se colocó 100 µL de las diluciones de los extractos etanólicos de 25, 50, 100 y 200 mg/mL del tallo y hojas a evaluar en los pozos hechos previamente en cada placa, también los discos del control positivo y control negativo se dejó reposar por 1 hora a temperatura ambiente y luego se llevó a incubación de 37° C durante 24 horas.

#### **f) Lectura de resultados**

Después de transcurrido el tiempo de incubación, se observaron zonas claras de inhibición de crecimiento bacteriano y se midieron los diámetros en mm (se incluyó la medida de 10 mm del pozo). Se considera una actividad antibacteriana significativa si posee un halo mayor a 18 mm a 25 mg/mL<sup>56</sup>, la prueba se realizó por triplicado con la finalidad de obtener datos significativos.

#### **3.3.5.2. Método de microdilución**

Se realizó la prueba de microdilución colorimétrica de las muestras con el fin de determinar la CMI (concentración mínima inhibitoria del crecimiento de las bacterias) para dicha prueba se usó el protocolo CLSI M07-A10 modificado<sup>58</sup>.

#### **a) Microorganismos de estudio.**

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) se utilizaron las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922 del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

#### **b) Preparación de la muestra**

Los extractos secos de los tallos y hojas fueron resuspendidos en DMSO a la concentración de 200 mg/mL, esta solución fue diluida en diluciones dobles seriadas, adaptando al esquema de diluciones de drogas insolubles en agua, del protocolo CLSI M07-A10<sup>58</sup>, obteniendo diluciones dobles con concentraciones finales, en el rango de 15,62 – 8000 µg/mL, utilizando como diluyente final caldo Mueller-Hinton.

#### **c) Preparación de los controles**

Se utilizó ciprofloxacino para la prueba como control positivo, este se solubilizó en agua y fue preparado a 6400 µg/mL siguiendo las normas del CLSI a una concentración mínima 100 veces mayor a la concentración a la ser probada, en este caso 64 µg/mL. La concentración del control fue desde 0,125 a 64 µg/mL<sup>58</sup>.

#### **d) Preparación de la suspensión del inóculo**

Se preparó el inóculo, para ello se reactivó las bacterias en TSA 24 horas antes e incubado a condiciones aeróbicas a 37°C, las colonias fueron transferidos a un tubo de ensayo que contiene solución salina 0,9 %, hasta ajustarlo a la turbidez equivalente al tubo 0.5 de McFarland. En seguida se realizó una doble dilución en 1:30 y luego 1:5 con caldo Mueller-Hinton con el fin de obtener un inóculo 2X. Se agregó 100 µL de solución de resazurina (20 mg/mL) por cada 20 mL de la suspensión del inóculo 2x<sup>59</sup>.

### e) Inoculación e incubación

Para dicha prueba se utilizó una microplaca estéril de 96 pozos, de fondo en U. se tomó la primera y la última columna como control de esterilidad (CE) y control de crecimiento (CC) respectivamente. En la columna del 2 al 11 se agregó 100  $\mu$ L de las diluciones 2X de la muestra y 100  $\mu$ L del inóculo 2X con el indicador resazurina. Las microplacas se incubaron a 37° C durante 24 horas en condiciones aeróbicas<sup>58</sup>.

### f) Lectura de resultados

Las lecturas de los resultados se evaluaron visualmente, la concentración más baja en la que no se evidencia cambio de color de la resazurina (de púrpura a rosado o incoloro) se tomó como el valor de CMI, la prueba se realizó por triplicado con la finalidad de obtener datos significativos.

Para la interpretación de los resultados se tomó en cuenta los parámetros de Paredes *et al*<sup>36</sup>. Se considera que los extractos vegetales poseen una actividad antimicrobiana significativa cuando la CMI presenta valores menores o iguales a 1000  $\mu$ g/mL, dividiéndose esta como débil, moderada y buena siendo esta última cuando la CMI es de 100  $\mu$ g/mL (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Clasificación de la actividad antimicrobiana<sup>36</sup>.

Actividad antimicrobiana	CMI ( $\mu$ g/mL)
Débil	500 a 1000
Moderada	100 a < 500
Buena	< 100

### **3.3.6. Formulación del gel base de carbomer**

#### **a) Selección de excipientes**

Se preparó un gel con diversas formulaciones con el fin de lograr características adecuadas en consistencia y apariencia, teniendo en cuenta la seguridad y la estabilidad física y química. Se añadió excipientes faltantes teniendo en cuenta las características de la formulación.

#### **b) Proceso de preparación del gel base**

Se colocó en un recipiente X g de carbomer (dependiendo de la formula), se agregó 1 mL de glicerina y agua destilada c.s.p. 100 mL, con la ayuda de una bagueta se agitó enérgicamente hasta la dispersión completa. Seguidamente se añadió gota a gota la base gelificante (trietanolamina) hasta llegar a un pH neutro. Se registró las características del gel.

### **3.3.7. Incorporación del extracto seco**

Se colocó en un recipiente X g de carbomer (dependiendo de la formula), se agregó agua destilada c.s.p. 50 mL, con la ayuda de una bagueta se agitó enérgicamente hasta la dispersión completa (Mezcla A) en otro recipiente se preparó una solución al 20 % del extracto seco (Tallo o Hoja) con 1 mL de glicerina y agua destilada c.s.p. 50 mL (Mezcla B).

En otro recipiente se colocó la Mezcla A y X mL de la mezcla B según la concentración final a alcanzar, se completó con agua destilada c.s.p. 100 mL. Seguidamente se añadió gota a gota la base gelificante (trietanolamina) hasta llegar a un pH neutro.

### **3.3.8. Evaluación de la actividad antibacteriana del gel con los extractos del tallo y las hojas del *Marrubium vulgare* L. al 1 %, 2 % y 4 % (P/V)**

#### **a) Preparación de las muestras:**

Se preparó el gel base con la formulación que brindo características adecuadas, a este se le incorporo el X mL de una solución madre del extracto del tallo y hojas al 20 % hasta llegar a la concentración de 1 %, 2 % y 4 %.

#### **b) Inoculación e incubación:**

Se colocó 0,1 mL de las diferentes muestras a evaluar en los pozos hechos previamente en cada placa. Se dejó reposar por 1 hora a temperatura ambiente y luego se llevó a una temperatura de incubación de 35° C durante 24 horas. Se usó como control negativo el gel de carbomer sin extracto.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Descripción del extracto seco

Después de obtener el extracto seco de los tallos y las hojas del *Marrubium vulgare* L. se describió las características organolépticas y la prueba de solubilidad.

**Tabla 3.** Características organolépticas de los extractos secos del *Marrubium vulgare* L.

Características organolépticas	Extractos secos	
	Hojas	Tallos
Aspecto	Semisólido untuoso	Semisólido untuoso
Color	Verde oscuro	Pardo oscuro
Olor	Característico	Característico
sabor	Característico	Característico

**Tabla 4.** Solubilidad de los extractos secos del *Marrubium vulgare* L.

Solubilidad del extracto seco		Extractos secos (mg/mL)			
		25	50	100	200
Hojas	Agua	+	+	+	+
	Etanol 96	+	+	+	+
	Etanol – Agua (1:1)	+	+	+	+
	DMSO	+++	+++	+++	++
Tallos	Agua	+	+	+	+
	Etanol 96	+	+	+	+
	Etanol – Agua (1:1)	+	+	+	+
	DMSO	+++	+++	+++	++

**Leyenda:** (-) insoluble, (+) poco soluble, (++) soluble, (+++) muy soluble



## 4.2. Marcha fitoquímica

Se determinó la presencia de los principales metabolitos secundarios en el extracto seco de los tallos y las hojas del *Marrubium vulgare* L.

**Tabla 5.** Screening fitoquímico de los extractos etanólicos

Metabolito secundario	Reactivo	Extractos secos	
		Hojas	Tallos
Compuestos fenólicos	Reactivo de cloruro férrico	+++	+++
Taninos	Solución de gelatina al 5%	++	++
	Reactivo de cloruro férrico	+++	+++
	Solución de dicromato de potasio	+++	+++
Flavonoides	Reactivo de Shinoda	-	-
Aminoácidos libres	Reactivo de Ninhidrina	-	-
Azúcares reductores	Reactivo de Fehling	+	++
Saponinas	Prueba de espuma	+	++
Esteroides y triterpenos	Reactivo de Liebermann-Burchard	-	-
	Reactivo de Baljet	-	-
	Reactivo de Legal	-	-
Alcaloides	Reactivo de Dragendorff	+	+
	Reactivo de Mayer	+	+
	Reactivo de Wagner	+	+
	Reactivo de Bertrand	+	+

**Leyenda:** (++++ ) muy abundante; (++++) abundante; (++) regular; (+) poca cantidad; (-) ausente.

### 4.3. Determinación de la actividad antibacteriana

#### 4.3.1. Método de difusión en agar

Se realizó la determinación de la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922 frente al extracto de las hojas y el tallo del *Marrubium vulgare* L. Se usó trimetoprim-sulfametoxazol 25 µg/disco y ciprofloxacino 5 µg/disco como control positivo y DMSO como control negativo.

**Tabla 6.** Promedio de diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano del extracto del tallo del *Marrubium vulgare* L.

Microorganismos		Extracto etanólico del tallo (mg/mL)			
		25	50	100	200
Zona de inhibición (mm)					
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	12,17 ± 0,41	13,5 ± 0,55	15,67 ± 0,52	17,67 ± 0,52
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	14,5 ± 0,55	16,83 ± 0,75	18,67 ± 0,52	19,5 ± 0,55
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	15,67 ± 0,52	18,5 ± 0,84	18,83 ± 0,75	19,83 ± 0,41
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ± 0	14,33 ± 0,52	17,5 ± 0,55	19,67 ± 0,52
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10,5 ± 0,55	11,33 ± 0,82	15,17 ± 0,75	17,33 ± 0,82

**Tabla 7** Promedio de diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano del extracto de las hojas del *Marrubium vulgare* L.

Microorganismos		Extracto etanólico de las hojas (mg/mL)			
		25	50	100	200
		Zona de inhibición (mm)			
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15,5 ± 0,55	17,33 ± 0,52	18,5 ± 0,55	21,17 ± 0,41
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	15,33 ± 0,82	17,5 ± 0,55	20,33 ± 0,82	21,67 ± 0,82
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12,67 ± 0,52	15,67 ± 0,52	18,67 ± 0,82	20,83 ± 0,75
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ± 0	16,83 ± 0,41	18,5 ± 0,55	22,17 ± 0,75
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10 ± 0	10,83 ± 0,98	12,17 ± 0,41	12,83 ± 0,98

**Tabla 8.** Promedio de diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano del control negativo (DMSO) y los controles positivos (trimetoprim-sulfametoxazol 25 µg/disco y ciprofloxacino 5 µg/disco).

Microorganismos		Zona de inhibición (mm)		
		Controles		
		Negativo	Positivos	
		DMSO	ciprofloxacino 5 µg/disco	trimetoprim-sulfametoxazol 25 µg/disco
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10	34	31
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	10	42	15
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	10	53	34
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10	6	6
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10	44	12

#### 4.3.2. Determinación de la CMI por el método de microdilución colorimétrica en microplaca

Se determinó el CMI de los extractos seco de las hojas y el tallo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Se usó ciprofloxacino como control positivo. Los resultados se detallan a continuación:

**Tabla 9.** Valores promedio de la concentración mínima inhibitoria de los extractos secos del *Marrubium vulgare* L. (tallos y hojas) y control positivo (ciprofloxacino) sobre 5 bacterias.

Microorganismos		Concentración mínima inhibitoria (µg/mL)		
		Extracto etanólico		ciprofloxacino
		Tallo	Hoja	
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1266,67 ± 457,74	666,67 ± 243,98	0,21 ± 0,06
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	1200 ± 414,04	633,33 ± 228,87	≤0,125
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	733,33 ± 258,2	300 ± 103,51	≤0,125
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>4000	>4000	0,22 ± 0,06
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>4000	>4000	32 ± 0

#### 4.4. Formulación del gel antibacteriano

##### 4.4.1. Pruebas de formulación

Se probaron distintas formulaciones, haciendo uso de diversas concentraciones de carbomer (0.3 %, 0.5 %, 1 % y 1.2 %) respectivamente con el fin de obtener un gel de características adecuadas.

**Tabla 10.** Pruebas de formulación del gel de carbomer.

	Formulación			
	I	II	III	IV
Glicerina	1 mL			
Carbomer	0.3 g	0.5 g	1 g	1.2 g
Agua destilada	c.s.p. 100 mL			
Trietanolamina	c.s.p. pH 7			

##### 4.4.2. Establecimiento de la formulación

Según lo obtenido en las pruebas de formulación, se encontró que la formulación II y III poseen características adecuadas de consistencia. De tal manera que a ambos se les incorporaron los extractos secos reconstituidos.

**Tabla 11.** Formulación del gel de carbomer.

Formulación II	Formulación III
Glicerina 1 %	Glicerina 1 %
Carbomer 0.5 %	Carbomer 1 %
Agua destilada 98.5 %	Agua destilada 98 %
TEA c.s.p pH 7	TEA c.s.p pH 7

##### 4.4.3. Incorporación del extracto seco

Se observó en la formulación II, el gel formulado presento incompatibilidades físicas después de incorporar el extracto en la formula a partir del 1 % y 2 % del extracto seco de tallo y hoja respectivamente. Para el caso de la formulación III conservo su consistencia en todos los casos, así que este fue tomado en cuenta para las posteriores pruebas antimicrobianas.

**Tabla 12.** Formulación del gel base incorporado con el extracto seco.

Formulación II y III						
	Tallo	Hoja	Tallo	Hoja	Tallo	Hoja
Extracto seco	1 g		2 g		4 g	
Glicerina	1 mL					
Carbomer	0.5 g (formulación II) / 1 g (formulación III)					
Agua destilada	c.s.p 100 mL					

#### 4.4.4. Características del gel base de carbomer

**Tabla 13.** Características del gel base de carbomer

Parámetros	Resultados
<b>Aspecto</b>	Homogéneo
<b>Color</b>	Transparente
<b>Olor</b>	Sui generis
<b>Presencia de grumos</b>	Negativo
<b>pH</b>	7.12

#### 4.5. Determinación de la actividad antibacteriana del gel con la adición de los extractos secos (tallos y hojas)

Se consideró la formula III como la de características adecuadas, teniendo concentraciones de tallo y hojas al 1 %, 2 % y 4 %. Se procedió a realizar la prueba de difusión en agar con el fin de determinar la acción antibacteriana. Se considera el gel base como control negativo.

**Tabla 14.** Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano del gel con los extractos secos del tallo de *Marrubium vulgare L.* a una concentración del 1 %, 2 % y al 4 %.

Microorganismos		Zona de inhibición (mm)			
		Gel			
		Tallo			
		Blanco	1 %	2 %	4 %
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10 ± 0	19,67 ± 0,52	24,5 ± 0,55	26,33 ± 0,82
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	10 ± 0	18 ± 1,1	20,17 ± 0,75	23 ± 1,55
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	10 ± 0	15,33 ± 0,52	18,33 ± 0,52	22,67 ± 0,52
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0

**Tabla 15.** Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano del gel con los extractos secos de las hojas de *Marrubium vulgare L.* a una concentración del 1 %, 2 % y al 4 %.

Microorganismos		Zona de inhibición (mm)			
		Gel			
		Hoja			
		Blanco	1 %	2 %	4 %
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10 ± 0	20 ± 0,63	24,5 ± 0,55	26,33 ± 0,52
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	10 ± 0	18,83 ± 0,75	25,33 ± 0,52	28,33 ± 0,52
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	10 ± 0	14,83 ± 0,41	18,5 ± 0,55	22,17 ± 0,75
Bacterias Gram (-)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	10 ± 0

## V. DISCUSIÓN

En la **tabla 5** se muestra el estudio fitoquímico que se le realizó tanto a los tallos como a las hojas, se le encontró compuestos fenólicos, taninos, saponinas, azúcares reductores y alcaloides; resultados similares a lo obtenido por Kurbatova *et al.* quien señala que el efecto terapéutico de esta planta se debe a la presencia de taninos (5,2 %), aminoácidos, saponinas, carbohidratos, flavonoides, etc. es decir a la sinergia de los metabolitos presentes en la planta<sup>60</sup>. Otro estudio realizado a esta especie demuestra la presencia de una variedad de componentes como alcaloides, esteroides, lactonas, terpenos, taninos, azúcares y vitamina C<sup>18</sup>.

Se determinó la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de las hojas y tallo del *Marrubium vulgare* L. por el método de difusión en agar, se muestra en la **tabla 8** el efecto del extracto seco del tallo frente a la cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ( $18,67 \pm 0,52$  mm) y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ( $18,83 \pm 0,75$  mm), mientras que en la **tabla 9** se muestra el efecto del extracto seco de las hojas presento actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ( $18,5 \pm 0,55$  mm), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ( $20,33 \pm 0,82$  mm), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ( $18,67 \pm 0,82$  mm) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ( $18,5 \pm 0,55$  mm) a la concentración de 100 mg/mL, dicho resultado se compara al estudio realizado por Masoodi *et al.* donde se usa un extracto metanólico de las partes aéreas demostrando acción antibacteriana a la concentración de 600 mg/mL frente a *Bacillus subtilis* MTCC 619, *Staphylococcus epidermidis* MTCC 435 y *Staphylococcus aureus* MTCC 740<sup>61</sup>. Por otro lado, Khadidja *et al.* donde se usa un extracto metanólico de las partes aéreas, obteniendo la acción antimicrobiana a la concentración de 500 mg/mL frente a *Enterobacter sp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter baumannii*<sup>17</sup>. La diferencia en los resultados puede deberse a las condiciones de desarrollo y la de crecimiento, el genotipo, el almacenamiento así como al métodos y solvente usado en la extracción de los metabolitos<sup>62,63</sup>.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrico en microplaca, tanto para el extracto etanólico de los tallos como las hojas de *Marrubium vulgare* L. , en la **tabla 11** se observa los valores



promedios de la CMI menor a 1000 µg/mL en las hojas frente a bacterias Gram (+): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CMI = 666,67 µg/mL), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (CMI = 633,33 µg/mL) y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CMI = 300 µg/mL), mientras que en el caso del tallo se observó un CMI de 733,33 µg/mL para el *Bacillus subtilis* ATCC 6633, mientras que para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 fueron 1266,67 µg/mL y 1200 µg/mL respectivamente, por otra parte no presentó actividad a una concentración ≤ 4000 µg/mL frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

En un estudio realizado por Bokaeian *et al.* donde se usa el extracto etanólico de las partes aéreas y el aceite esencial, se determinó la CMI por el método de Yu *et al.*<sup>62</sup> frente a *Staphylococcus aureus* para lo cual se obtuvo 2500 µg/mL para el extracto y 300 µg/mL para el caso del aceite esencial. No se presentó evidencia significativa entre lo obtenido por el extracto frente al aceite esencial ( $p < 0.05$ )<sup>27</sup>.

En un estudio realizado por Khadidja *et al.* se usa el extracto metanólico de las partes aéreas para determinar la CMI usando el método descrito por Consentino *et al.*<sup>63</sup> frente a *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Acinetobacter baumannii* mediante la determinación de la turbidez cada dos horas a una longitud de onda de 620 nm obteniendo una CMI significativa para *Staphylococcus epidermidis* a una concentración de 625 µg/mL<sup>17</sup>, esta actividad se le atribuye a la presencia de flavonoides y ácidos fenólicos<sup>28</sup>.

En un estudio realizado por Zarai *et al.* hacen uso del aceite esencial para la determinación de la MIC por el método de microdilución modificado<sup>64</sup> frente a un grupo de bacterias Gram (+) y Gram (-) usando MTT como indicador colorimétrico obteniendo una CMI en el rango de 560 a 1100 µg/mL para las bacterias Gram (+) destacando el *Staphylococcus epidermidis* (CMI = 590 µg/mL) y *Staphylococcus aureus* 25923 (CMI = 1150 µg/mL) por otro lado los Gram (-) no presenta actividad significativa<sup>28</sup>.

Se presenta un estudio en otra especie: el extracto de las partes aéreas del *Marrubium peregrinum* L. usando diversos solventes, entre ellos el metanol usando

el método de microdilución con resazurina<sup>65</sup> frente a 22 microorganismos, se evidencio actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CMI = 312,5 µg/mL), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CMI = 312,5 µg/mL), *Escherichia coli* ATCC 25922 (CMI = 5000 µg/mL) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (CMI = 1250 µg/mL)<sup>68</sup>.

La actividad antibacteriana del *Marrubium vulgare* L. se debe a la sinergia de los metabolitos presentes en el extracto vegetal, aunque se asocia principalmente a su contenido de compuestos oxigenados y grupos fenólicos<sup>69</sup>.

Las bacterias Gram (-) presenta una cubierta de lipopolisacaridos restringe la difusión de componentes hidrofóbicos mientras que en el caso de las Gram (+) al poseer una bicapa de fosfolípidos en la membrana celular permite la permeabilidad<sup>70</sup> lo que demostraría la sensibilidad de las bacterias Gram (+) pero no de las Gram (-) al extracto vegetal que demostró la presencia de flavonoides, taninos, etc.

Aunque se tiene la idea de que la actividad antibacteriana de un extracto vegetal se debe a la sinergia de los componentes, hay ciertos metabolitos que son responsables en gran medida de la actividad. En un estudio realizado por Djahra *et al.* se realiza la evaluación de la actividad antibacteriana de los taninos del *Marrubium vulgare* L. obtenido por un extracto hidroalcoholico de las hojas para su posterior separación de los taninos obteniéndose un rendimiento de 11.44%. Se determinó la actividad antibacteriana usando el método Kirby Bauer modificado usando 8 microorganismos enfrentándolos a 3 diferentes grados de pureza de los taninos obtenidos por extracciones sucesivas, se obtuvo actividad significativa frente a *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas* ATCC 27853, *Escherichia coli* 1429 y *Escherichia coli* 1554 en agar Mueller Hinton<sup>71</sup>.

Los taninos ejercen un efecto inhibitorio y letal sobre diferentes cepas incluyendo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*<sup>72</sup>. Por último, los taninos tienen la capacidad de prevenir el desarrollo de las colonias bacterianas mediante la destrucción de la pared celular<sup>73</sup>.

Luego de realizar las diversas pruebas de formulación se muestra en la **tabla 12** que la formula III es estable a la incorporación de los extractos secos de tallo y

hojas al 1 %, 2 % y 4 %, al probar los distintos geles formados frente a las bacterias mediante el método difusión en agar, se observa en la **tabla 16** y en **tabla 17** que presenta efecto frente a Gram (+) y no hay acción frente a Gram (-). En un estudio realizado por Andrade *et al.* demostraron que las formas farmacéuticas tipo gel otorga fácil liberación de los metabolitos del extracto vegetal y ninguno proveniente del polímero, dado que no se detectaron absorbancia en el rango de longitud de onda estudiado<sup>74</sup>.

Se elige un gel de carbomer debido a que al incorporarse sobre la piel y luego cuando se seca provoca un efecto oclusivo que impide la pérdida de agua de la piel, hidratando el estrato corneo, perdiendo su arreglo densamente empaquetado así facilita la difusión de los metabolitos de los extractos vegetales<sup>75</sup>.

## VI. CONCLUSIONES

1. El extracto de tallo y hojas presentó actividad antibacteriana a la concentración de 100 mg/mL frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en caso del extracto de las hojas. No presenta actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ni *Escherichia coli* ATCC 25922.
2. La concentración mínima inhibitoria en µg/mL del extracto del tallo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 es  $1266.67 \pm 457.74$  µg/mL,  $1200 \pm 414.04$  µg/mL y  $733.33 \pm 258.2$  µg/mL respectivamente mientras que del extracto de la hoja frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 es  $666.67 \pm 243.98$  µg/mL,  $633.33 \pm 228.87$  µg/mL y  $300 \pm 103.51$  µg/mL respectivamente, para el caso de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922 presentó una CMI superior a 4000 µg/mL.
3. El gel preparado con el extracto de tallo y hojas demostró actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 a partir de la concentración de 1 % mientras que para el *Bacillus subtilis* ATCC 6633 presento acción a partir del 2%, no se evidencio acción frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ni *Escherichia coli* ATCC 25922 en ninguna concentración.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Las propiedades farmacológicas de los extractos vegetales se deben generalmente a la sinergia de los metabolitos presentes en esta, diversos estudios indican a que ciertas propiedades se deben a una u otra familia de metabolitos. Por ello, se debe hacer una extracción selectiva de dichos metabolitos para probar su acción y así poder aislar la molécula responsable.
2. El material vegetal de donde se obtiene el extracto no presenta la misma composición de los metabolitos porque estos dependen de varios factores como, por ejemplo: factores climáticos, edáficos, así como por el método solvente de extracción. Por ello, se debe estandarizar estos factores para poder maximizar el grado de obtención de los metabolitos.
3. El método de microdilución colorimétrica nos brinda la ventaja de que es más rápida y menos laboriosa, por ello es el más indicado en la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria; sin embargo, se puede optar por otros métodos que involucren mayor exactitud en el resultado.
4. La preparación del gel con el extracto presenta un color y olor no muy agradable, por ello se recomienda modificar la fórmula para poder darle un mejor color y olor, para poder obtener un producto más estético.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cañigueral S. La Fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? Revista de Fitoterapia. 2002; 2 (2):101-121.
2. OMS. Medicina tradicional: definiciones [Internet]. WHO. [citado 24 de julio de 2016]. Disponible en:  
[http://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/)
3. Pascual D, Pérez YE, Morales I, Castellanos I, González E. Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. MEDISAN. 2014;18(10):1467-74.
4. Alviano DS, Alviano CS. Plant Extracts: Search for New Alternatives to Treat Microbial Diseases. Curr Pharm Biotechnol. 2009; 10(1):106-21.
5. Romero O, Tortoriello J. Conocimiento sobre fitomedicamentos entre médicos del segundo nivel de atención. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2007; 45(5):453–458.
6. Hidalgo LF, Marroquín JE, Antigoni J, Samalvides F. Prevalencia de infecciones hospitalarias en un hospital peruano de nivel IV, en el año 2008. Rev Medica Hered. 2011; 22(2):76–81.
7. Maguiña Vargas C. Infecciones nosocomiales. Acta Med Perú. 2016; 33(3):175-7
8. Velásquez J, Hernández R, Pamo O, Candiotti M, Pinedo Y, Sacsquispe R, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. Rev Soc Perú Med Interna. 2013; 26(4):192-6.
9. Gastelo-Acosta Rosy M, Díaz-Sipión Roberto S, Maguiña Vargas Ciro. Carbapenemasas en bacterias Gram negativas no fermentadoras aisladas en servicios críticos del Hospital Regional Lambayeque, diciembre 2014 - julio 2015. Acta méd. Peru. 2016; 33(3):183-188.
10. Farnsworth NR, Akerele O, Bingel AS, Soejarto DD, Guo Z. Medicinal plants in therapy. Bull World Health Organ. 1985; 63(6):965–81.
11. Bhattaram VA, Graefe U, Kohlert C, Veit M, Derendorf H. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. Phytomedicine. 2002; 9(suppl 3):1–33.

12. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(2):179–89.
13. Iten F, Reichling J, Saller R. Adverse effects and interactions of phytotherapeutic drugs. *Ther Umsch.* 2002; 59(6):283–91.
14. Brack Egg A. Perú: biodiversidad, pobreza y bionegocios. [Internet] Texas: PNUD; 2004 [Citado 21 Ene 2018]. Disponible en: [https://books.google.com.pe/books/about/Biodiversidad\\_pobreza\\_y\\_bionegocios.html?id=czm5AAAAIAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.pe/books/about/Biodiversidad_pobreza_y_bionegocios.html?id=czm5AAAAIAAJ&redir_esc=y)
15. Martínez-Gordillo M, Fragoso-Martínez I, García-Peña M del R, Montiel O. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Rev Mex Biodivers.* 2013; 84(1):30–86.
16. Quattrocchi, U. *World Dictionary of Medicinal and Poisonous Plants: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms*, 1 ra. Ed. Florida: CRC Press; 2012.
17. Khadidja SL, Amina K, Nourdine N, Aicha TT. The in vitro evaluation of antibacterial effect of *Marrubium vulgare* L. leaf extract grown in Algeria. *CRBS.* 2016; 1(suppl 1):13 -20.
18. Meyre-Silva C, Cechinel-Filho V. A review of the chemical and pharmacological aspects of the genus *marrubium*. *Curr Pharm Des.* 2010; 16(31):3503-18.
19. Freixa B. Plantas medicinales y drogas vegetales. *Offarm.* 2002; 21(6):175–6.
20. Mostacero J, Castillo F, Mejía F, Gamarra O, Charcape J, Ramírez R. *Plantas Medicinales del Perú – Taxonomía, Ecogeografía, Fenología y Etnobotánica*. Trujillo: Asamblea Nacional de Rectores; 2011.
21. Masoodi MH. Recent developments in phytochemical and pharmacological studies of *Marrubium vulgare* L. *J Pharm Res.* 2011; 10:124–9.
22. Henderson MS, Mccrindle R. Premarrubiin. A diterpenoid from *Marrubium vulgare* L. *J Chem Soc C Org.* 1969; 2(15):2014–5.
23. Bayir B, Gündüz H, Usta T, Şahin E, Özdemir Z, Kayır Ö, et al. Chemical Composition of Essential Oil from *Marrubium Vulgare* L. Leaves. *J New Results Sci.* 2014; 6:44-50.

24. Boeris MA, Toso RE, Ochoa G, Manso D, Cuccolo M, Skliar M. Estudio de las propiedades antiinflamatorias de *Marrubium vulgare*. Cienc Vet. 2002; 1:1-6.
25. Pavela R. Insecticidal activity of certain medicinal plants. Fitoterapia. 2004; 75(7):745–9.
26. Ahmed MG, Nairy H, Narayana Charyulu R, Prabhu P. Formulation of chitosan based ciprofloxacin and diclofenac film for periodontitis therapy. Trop J Pharm Res. 2009; 8(1):33-41.
27. Bokaeian M, Saboori E, Saeidi S, Niazi A A, Amini-Borojeni N, Khaje H et al. Phytochemical Analysis, Antibacterial Activity of *Marrubium vulgare* L against *Staphylococcus aureus* in vitro. Zahedan J Res Med Sci. 2014; 16(10) :60-64.
28. Zarai Z, Kadri A, Ben Chobba I, Ben Mansour R, Bekir A, Mejdoub H, Gharsallah N. The *in-vitro* evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. Lipids Health Dis. 2011; 10:161.
29. Lee, Y., Howard, L.R. and Villalon, B. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. J. Food Sci. 1995; 60(3):473-476.
30. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M. and Pridham, J.B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Radic Res. 1995; 22(4):375-383.
31. Yoshida, M., Sakai, T., Hosokawa, N., Marui, N., Matsumoto, K., Fugioka, A., et al. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. FEBS Lett. 1990; 260(1):10-13.
32. Zang D, Hamauru Y (2003) Phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant properties of grebe. Red and yellow bell peppers. Food Agric Environ 2: 22–7.
33. Ávalos-Soto Joaquín, Treviño-Neávez Jaime Fco., Verde-Star Ma. Julia, Rivas-Morales Catalina, Oranday-Cárdenas Azucena, Moran-Martínez Javier et al. Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares. Rev. mex. cienc. Farm. 2014; 45(3):39-44.



34. Martínez Y, Soto F, Almeida M, Hermosilla R, Martínez O. Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón). Rev Cuba Plantas Med. 2012; 17(4):320–9.
35. Dixon RA. Natural products and plant disease resistance. Nature. 2001; 411(6839):843–7.
36. Paredes PFM, Vasconcelos FR, Paim RTT, Marques MMM, Morais D, Maia S, et al. Screening of Bioactivities and Toxicity of *Cnidoscolus quercifolius* Pohl. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2016; 4(1) [Consultado 3 Mar 2018]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2016/7930563/>
37. Perveen K, Bokhari N, Soliman D. Antibacterial activity of *Phoenix dactylifera* L. leaf and pit extracts against selected Gram negative and Gram positive pathogenic bacteria. J Med Plants Res. 2012; 6(2):296-300.
38. Adame J, Adame H. Plantas curativas del noreste mexicano: Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas y altiplano potosino. 1 ed. México: Ediciones Castillo; 2000.
39. Soto M. Efecto antibacteriano y antifúngico comparativo de los extractos acuosos del *Zea mays* L. (maíz morado), *Rubus glaucus* (mora andina); *Opuntia soherensii* (ayrampo) y diseño de un gel de limpieza cutánea. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2014.
40. Kinghorn AD, Balandrin MF. Human Medicinal Agents from Plants [Internet]. American Chemical Society; 1993 [citado el 24 de octubre de 2018]. 372 p. (ACS Symposium Series; vol. 534). Disponible en: <https://doi.org/10.1021/bk-1993-0534>
41. López Brea M, Domingo D. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioter. 2003; 16(4):385–93.
42. Meruane M, Rojas M. Desarrollo de la Piel y sus Anexos en Vertebrados. Int. J. Morphol. 2012; 30(4):1422-1433.
43. Concepción A, De la Peña R, Acosta J, González A. Rev Cuba Investig Bioméd [Internet]. 2007 [Consultado 15 Ene 2018];26(2). Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03002007000200009&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002007000200009&lng=es)

44. Santos B, Guerrero D. Administración de medicamentos: teoría y práctica. 1 ed. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, SA; 1994.
45. Herrera V, González J, Iglesia D. Actualización en el manejo de antibióticos en las infecciones superficiales de piel y partes blandas. Acta méd. peruana. 2006; 23(1):32–4.
46. Burillo A, Moreno A, Salas C. Microbiological diagnosis of infections of the skin and soft tissues. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007; 25(9):579–86.
47. Luby SP, Agboatwalla M, Feikin DR, Painter J, Billhimer W, Altamirano A, et al. Effect of handwashing on child health: a randomised controlled trial. Lancet Lond Engl. 2005 ;366(9481):225–33.
48. Lozano, J.; Santos, M.; González, F.; Hernández, T.; Navarro, M. Protocolos diagnósticos terapéuticos de infectología de la APE. 3 Ed. Madrid: ERGON; 2011.
49. Trillo F. Tratado de farmacia galénica. 1 Ed. Madrid: Luzán 5 S.A; 1993.
50. López M, Zea S. Current trend of space occupation by encrusting excavating sponges on Colombian coral reefs. Mar Ecol. 2005; 26:33-41.
51. Roldo M, Hornof M, Caliceti P. Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery: synthesis and *in vitro* evaluation. Eur J Pharm Biopharm. 2004; 57(1):115-21.
52. Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Int J Food Microbiol. 2004; 94(3):223-253.
53. Reyes, F., Palou, E. y Lopez, A. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de la determinación de los componentes de los aceites esenciales. Temas Selectos de ingeniería de Alimentos. 2014; 8:68-78.
54. Ruiz J, Huamaní M. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2005.
55. Lock O. Investigación Fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales. 2 Ed. Lima: Univ Catolica Peru; 1994.

56. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2003; 88(2–3):199–204.
57. Ruiz J. Actividad antifúngica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales. [Tesis de postgrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2013.
58. Patel JB, Cockerill III FR, Bradford PA. M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Tenth Edition. En: Clinical and Laboratory Standards Institute. USA; 2015.
59. Liu M, Seidel V, Katerere DR, Gray AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods.* 2007; 42(4):325-9.
60. Kurbatova, N., Muzychkina, R., Mukhitdinov, N., Parsidina, G. Comparative phytochemical investigation of the composition and content of biologically active substances in *Marrubium vulgare* and *M. alternidens*. *Chemistry of Natural Compounds.* 2003; 39(5):501-502.
61. Masoodi M, Ahmed B, Zargar I, Khan SA, Khan S, Singh P. Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare*. *Afr J Biotechnol.* 2008; 7(2):86-87.
62. Kuklinski C. Farmacognosia, estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1 Ed. Barcelona: Ediciones Omega; 2000.
63. Yu JQ, Lei JC, Yu H, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*. *Phytochemistry.* 2004; 65(7):881-884.
64. Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Mascia E., Arzedi E., Palmas F. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils. *Lett Appl Microbiol.* 1999; 29(2):130-135.
65. Wade D, Silveira A, Rollins-Smith L, Bergman T, Silberring J, Lankinen H: Hematological and antifungal properties of temporin A and a cecropin A-temporin A hybrid. *Acta Biochim Pol.* 2001; 48:1185-1189.

66. Sarker, S. D., Nahar, L., and Kumarasamy, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*. 2007; 42(4):321-324.
67. Radojević I, Stanković M, Stefanović O, Čomić L, Topuzović M, Vasić S, et al. Exploring antimicrobial activity of horehound, *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujev J Sci*. 2013; 35:99–106.
68. Oyedele O, Afolayan A. Comparative study of the essential oil composition and antimicrobial activity of *Leonotis leonurus* and *L. ocymifolia* in the Eastern Cape. *African J Bot*. 2005; 71(1):114-116.
69. Zhao WH, Hu ZO, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and  $\beta$ -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2001; 45(6):1737-1742.
70. Djahra, A.B., Bordjiba, O. & Benkherara, S. Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.). *Phytothérapie*. 2013; 11:348-52.
71. Doss A, Mohammed H, Dhanabalan R. Antibacterial activity of tannins from the leaves of *Solanum trilobatum* L. *Indian J Sci Technol* 2009; 2(2):41–3.
72. Erasto P, Bojase M, Majinda RRT. Antimicrobial and antioxidant flavonoids from the roots wood of *Bolusathus spesiosus*. *Phytochemistry*. 2004; 65(7):875–80.
73. Barbosa, H., Andrade, J., Gómez, C., Castellanos, L., & Osorno Reyes, O. Estudio de preformulación para el desarrollo de un gel a base de polímeros con capacidad mucoadhesiva para ensayos de alelopatía en invertebrados marinos. *Acta Biol. Colomb*. 2010; 15(1):87-104.
74. Jacobs RM, y Zanowiak P. Handbook of nonprescription drugs. 18 ed. Washington D. C. American Pharmaceutical Association Pub. 2014.

## IX. ANEXOS

### 9.1. Certificación de identificación botánica.

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ  
CONSULTOR BOTÁNICO  
C. B. P. N° 3796  
Tel: 017512863 RPM #963689079  
RD N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS



### CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

#### Certifica:


Que, **JIMMY LIMAYMANTA GONZALES**, estudiante de la E.A.P. Farmacia y Bioquímica – Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con fines de investigación científica, ha solicitado la certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de “**marrubio**”, la muestra ha sido determinada científicamente como *Marrubium vulgare* L. Y según el Sistema de Clasificación Botánica de Arthur Cronquist, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO : Plantae  
DIVISIÓN : Magnoliophyta  
CLASE : Magnoliopsida  
SUBCLASE : Asteridae  
ORDEN : Lamiales  
FAMILIA : Lamiaceae  
GENERO : *Marrubium*  
ESPECIE : *Marrubium vulgare* L.

Nombre vulgar: “marrubio”

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 15 de septiembre del 2017

  
José R. Campos De La Cruz  
BIOLOGO  
C.B.P. 3796

Jr. Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07 / e-mail: joricampos@yahoo.es

### Anexo 1. Clasificación botánica del *Marrubium vulgare* L.

## 9.2. Fotos del material biológico



**Anexo 2.** Partes aéreas del *Marrubium Vulgare L*

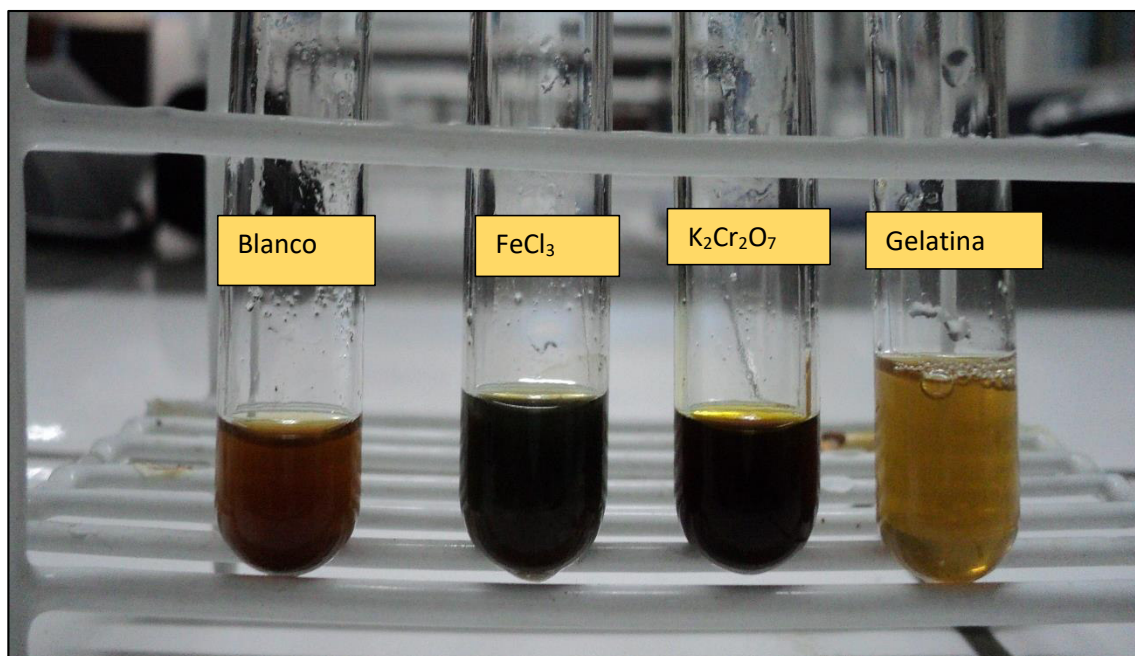


**Anexo 3.** Material seco y pulverizado del tallo del *Marrubium Vulgare L*.

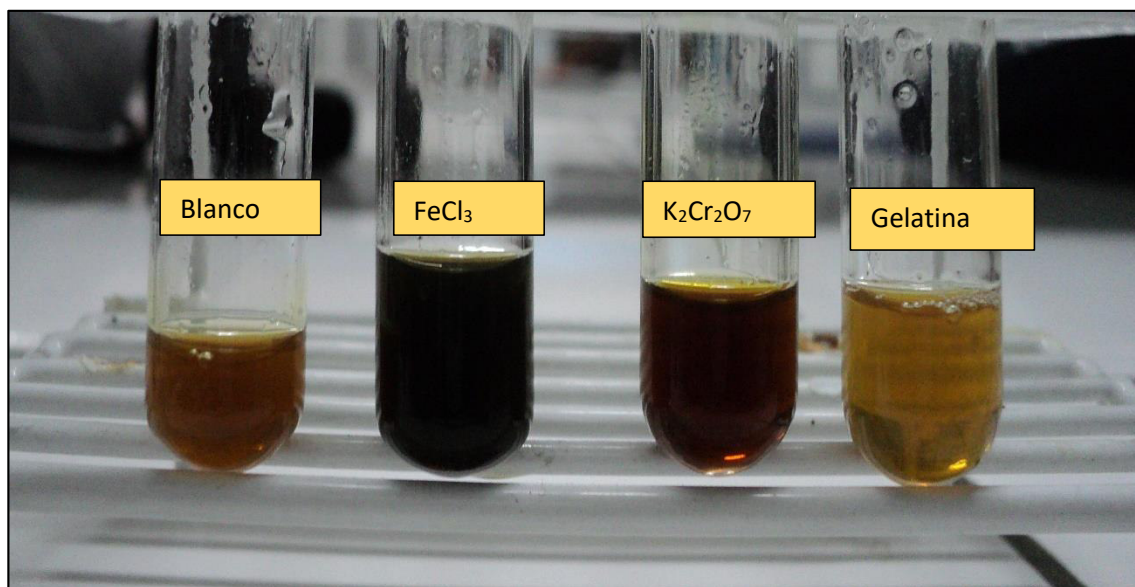
**Anexo 4.** Material seco y pulverizado de las hojas del *Marrubium Vulgare L*.







**Anexo 5.** Resultados del screening fitoquímico de la hoja (FeCl<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, gelatina).

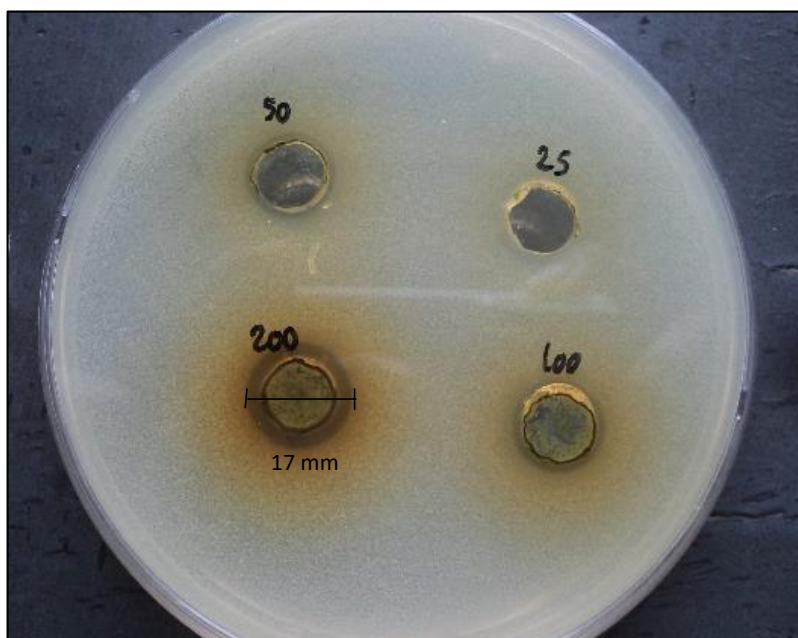


**Anexo 6.** Resultados del screening fitoquímico del tallo (FeCl<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, gelatina).



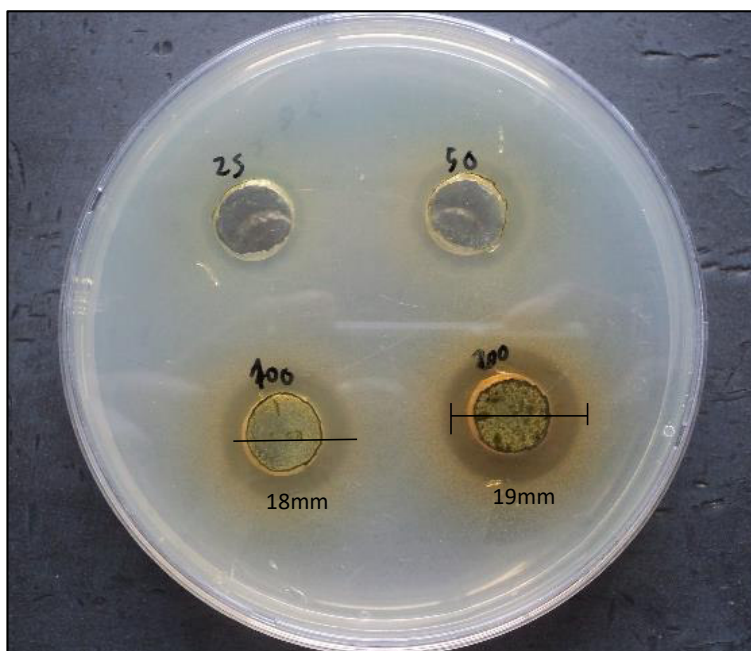
### Anexo 7. Material biológico.

#### 9.3. Evaluación antibacteriana del extracto seco de tallos y hojas por el método de difusión en agar

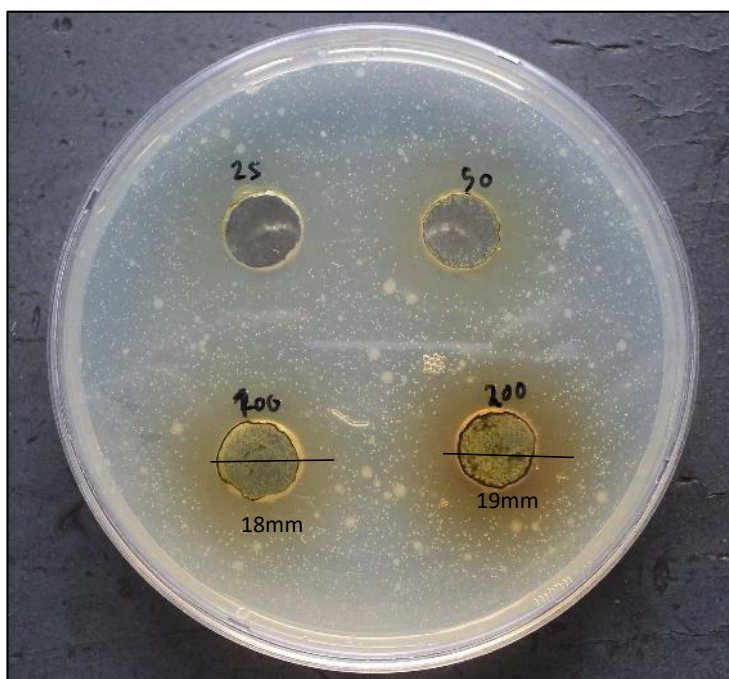


**Anexo 8.** Diámetros de los halos de la inhibición de crecimiento bacteriano del extracto seco del tallo del *Marrubium vulgare* L. mediante el método de difusión en agar frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

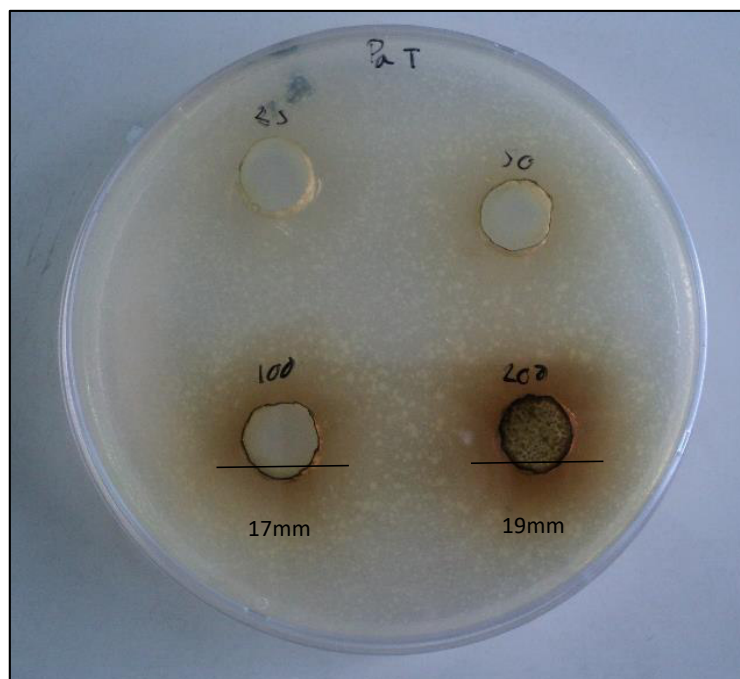




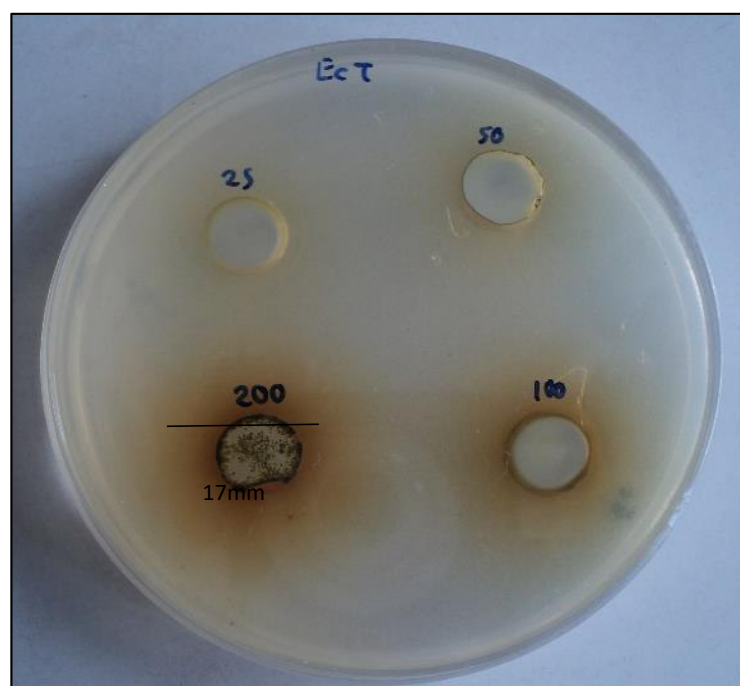
**Anexo 9.** Diámetros de los halos de la inhibición de crecimiento bacteriano del extracto seco del tallo del *Marrubium vulgare* L. mediante el método de difusión en agar frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.



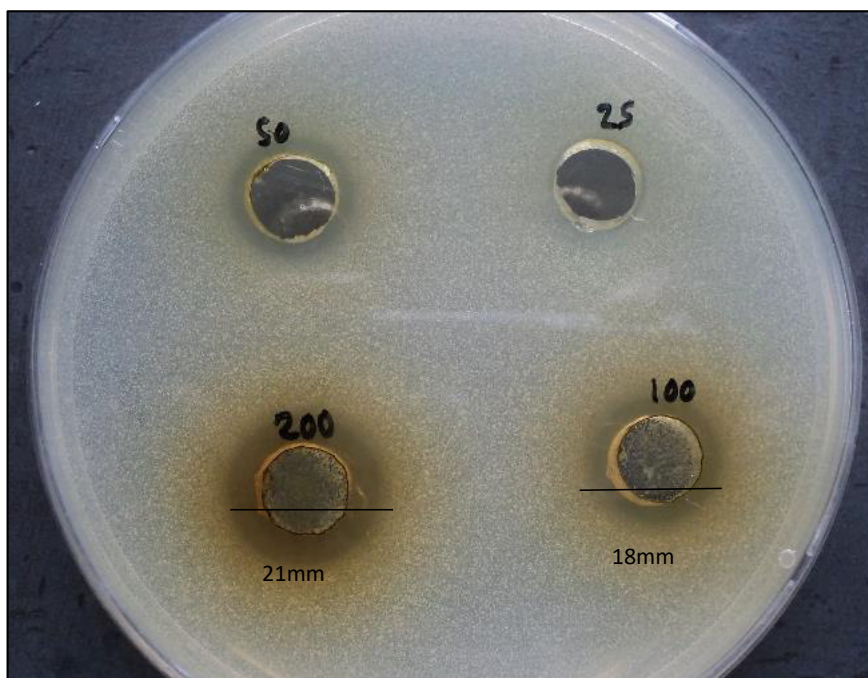
**Anexo 10.** Diámetros de los halos de la inhibición de crecimiento bacteriano del extracto seco del tallo del *Marrubium vulgare* L. mediante el método de difusión en agar frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633.



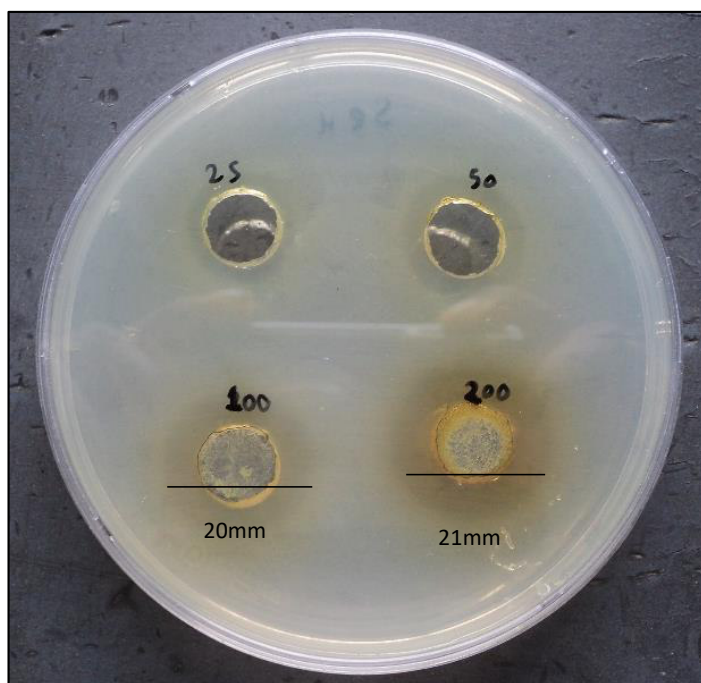
**Anexo 11.** Diámetros de los halos de la inhibición de crecimiento bacteriano del extracto seco del tallo del *Marrubium vulgare* L. mediante el método de difusión en agar frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



**Anexo 12.** Diámetros de los halos de la inhibición de crecimiento bacteriano del extracto seco del tallo del *Marrubium vulgare* L. mediante el método de difusión en agar frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

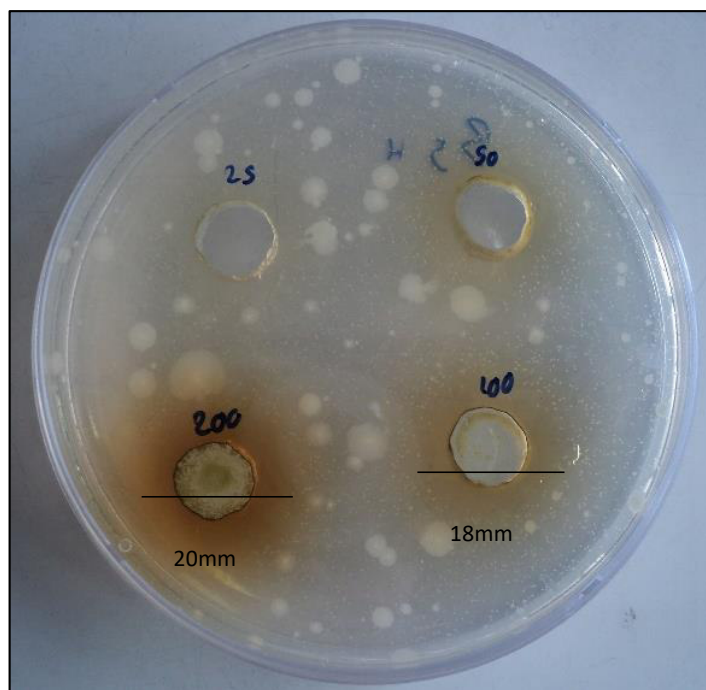


**Anexo 13.** Diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano del extracto seco de las hojas del *Marrubium vulgare* L. mediante el método de difusión en agar frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

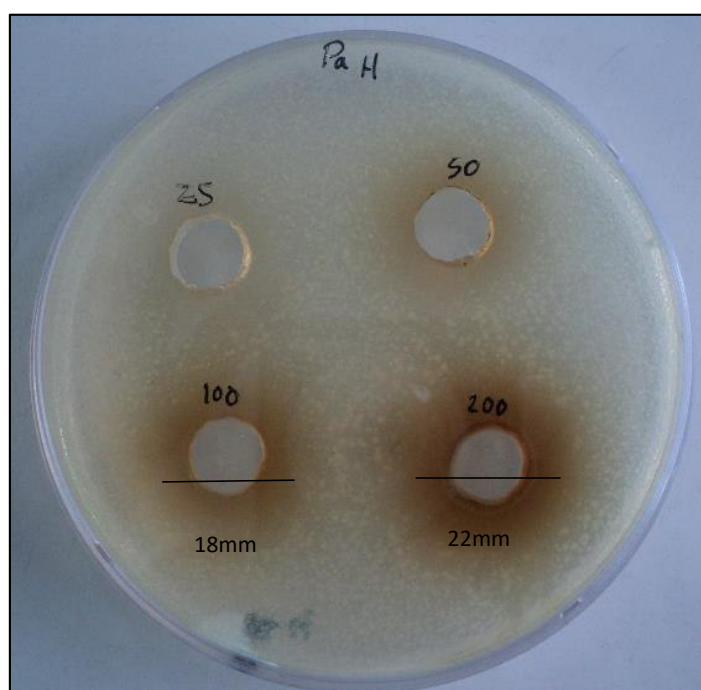


**Anexo 14.** Diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano del extracto seco de las hojas del *Marrubium vulgare* L. mediante el método de difusión en agar frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

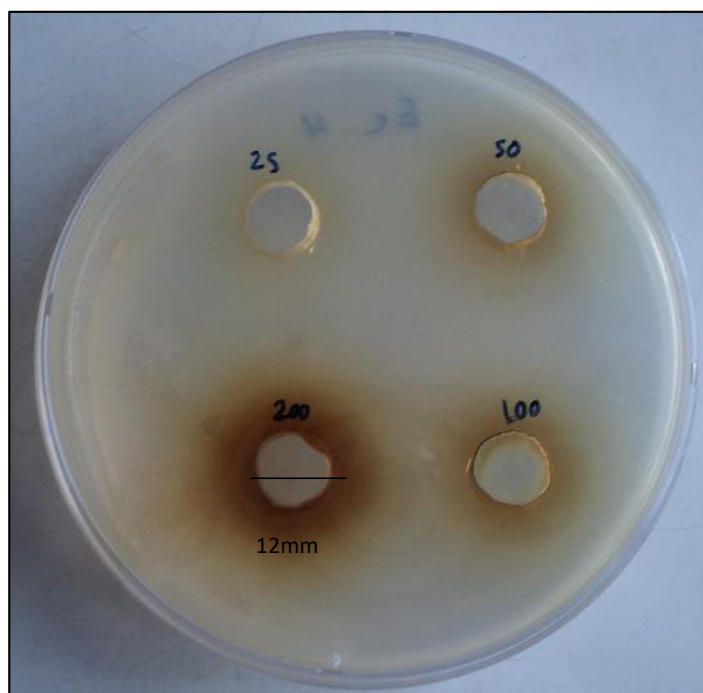




**Anexo 15.** Diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano del extracto seco de las hojas del *Marrubium vulgare* L. mediante el método de difusión en agar frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633.



**Anexo 16.** Diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano del extracto seco de las hojas del *Marrubium vulgare* L. mediante el método de difusión en agar frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



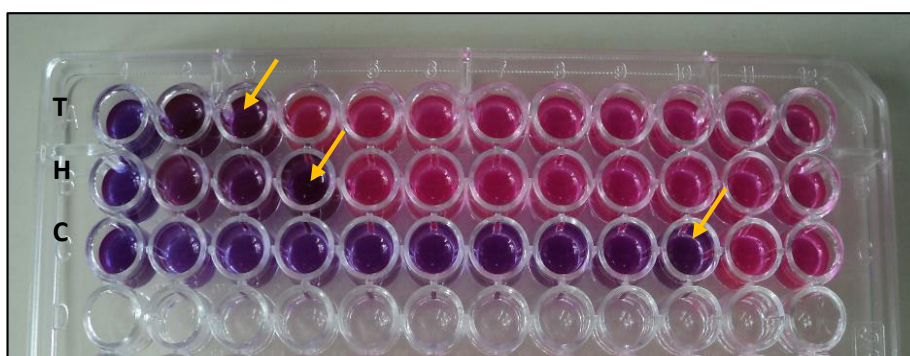
**Anexo 17.** Diámetros de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano del extracto seco de las hojas del *Marrubium vulgare* L. mediante el método de difusión en agar frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

#### 9.4. Determinación de la CMI por el método de microdilución colorimétrica.

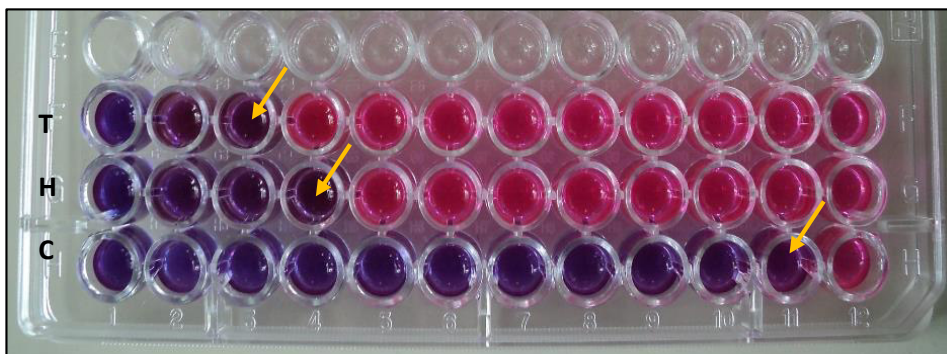
##### Anexo 18. Diseño de la placa de microdilución.

	CE	4000	2000	1000	500	250	125	62.5	31.25	15.62	7.81	CC
Tallo (T) µg/mL	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
Hoja (H) µg/mL	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12
Ciprofloxacino (C) µg/mL	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
		64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	

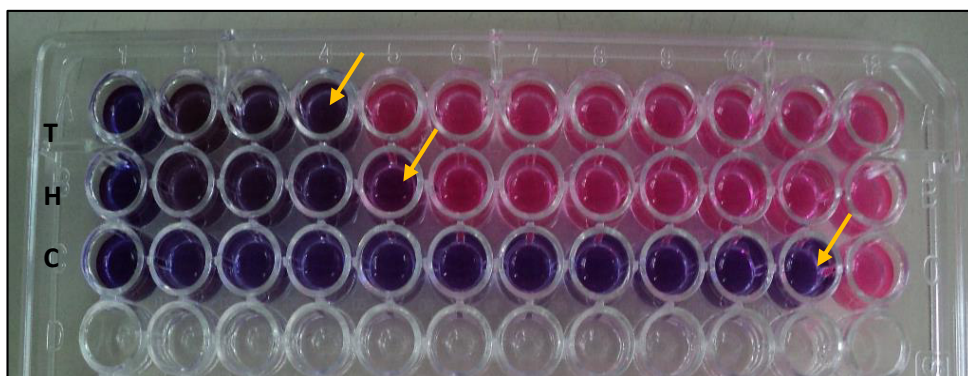
**Leyenda:** CE: control de esterilidad, CC: control de crecimiento.



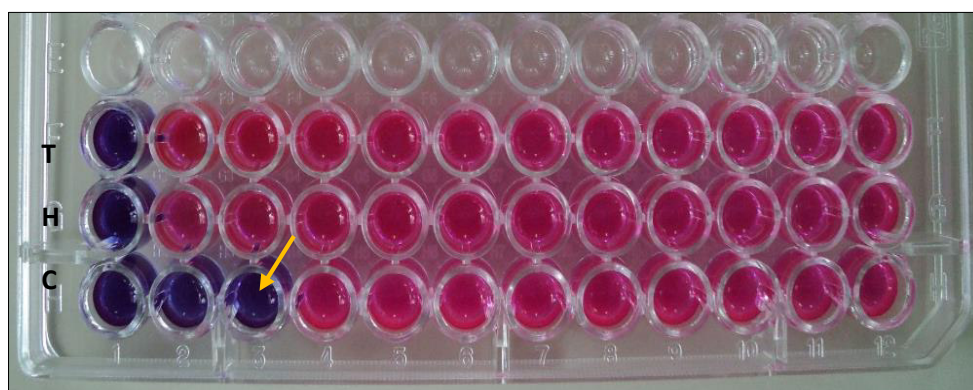
**Anexo 19.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Marrubium Vulgare L.* (tallos y hojas) y ciprofloxacino frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



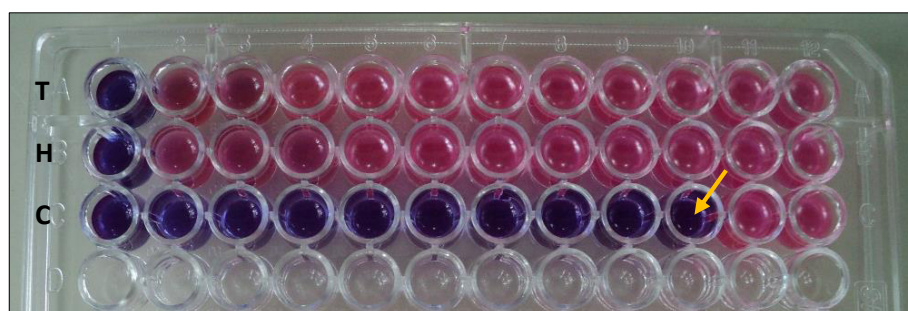
**Anexo 20.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Marrubium Vulgare L.* (tallos y hojas) y ciprofloxacino frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.



**Anexo 21.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Marrubium Vulgare* L. (tallos y hojas) y ciprofloxacino frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633.



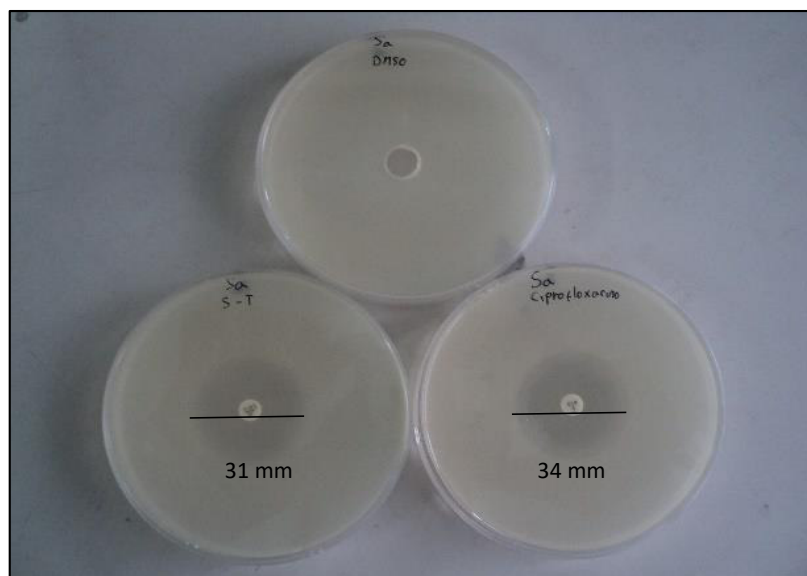
**Anexo 22.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Marrubium Vulgare* L. (tallos y hojas) y ciprofloxacino frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



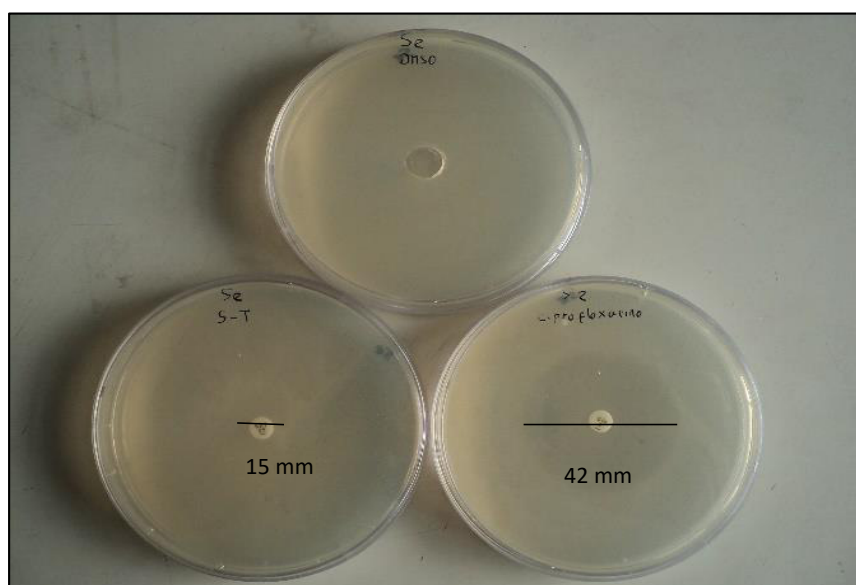
**Anexo 23.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Marrubium Vulgare* L. (tallos y hojas) y ciprofloxacino frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.



**9.5. Evaluación antibacteriana de los controles positivos (trimetropim/sulfametoxazol 25 µg/disco y ciprofloxacino 5 µg/disco) y negativo (DMSO) por el método de difusión en agar**

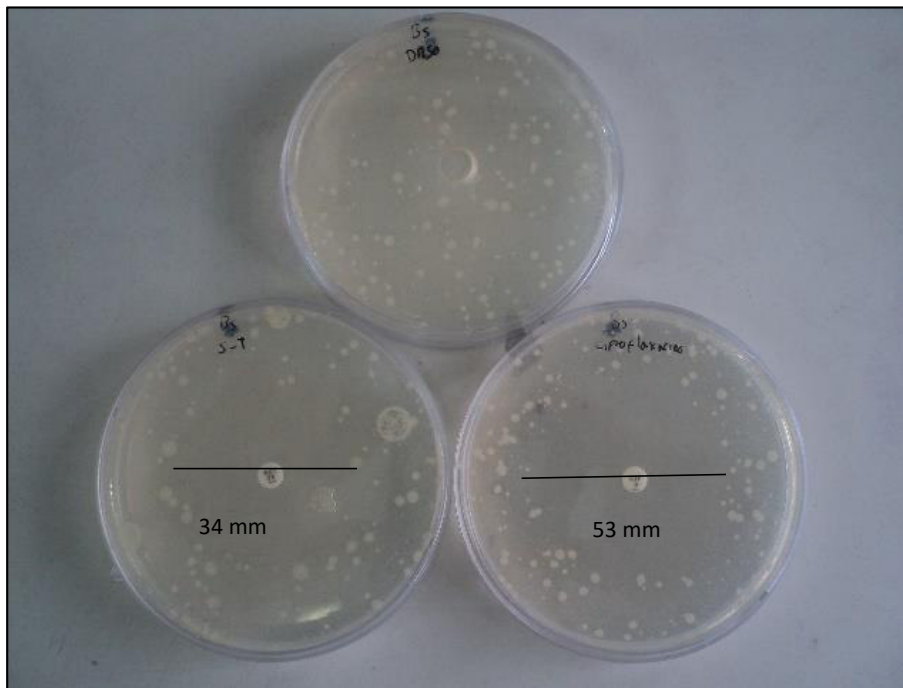


**Anexo 24.** Diámetro de los halos de la inhibición de los controles positivos (trimetropim/sulfametoxazol 25 µg/disco y ciprofloxacino 5 µg/disco) y negativo (DMSO) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

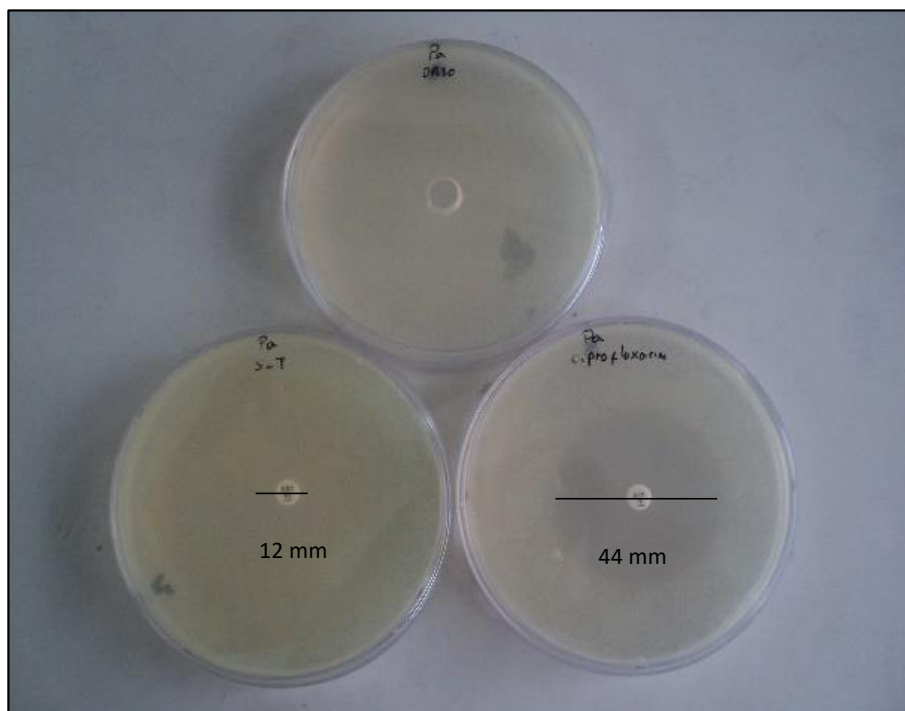


**Anexo 25.** Diámetro de los halos de la inhibición de los controles positivos (trimetropim/sulfametoxazol 25 µg/disco y ciprofloxacino 5 µg/disco) y negativo (DMSO) frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.





**Anexo 26.** Diámetro de los halos de la inhibición de los controles positivos (trimetropim/sulfametoxazol 25 µg/disco y ciprofloxacino 5 µg/disco) y negativo (DMSO) frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

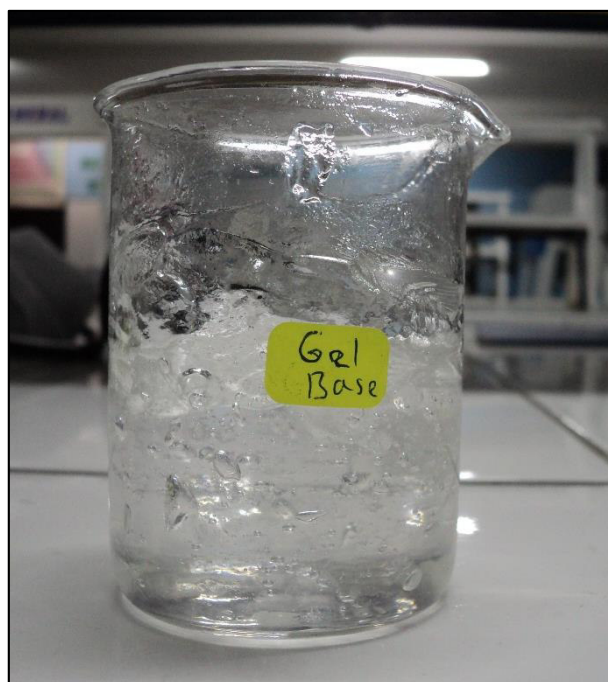


**Anexo 27.** Diámetro de los halos de la inhibición de los controles positivos (trimetropim/sulfametoxazol 25 µg/disco y ciprofloxacino 5 µg/disco) y negativo (DMSO) frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



**Anexo 28.** Formación de halos de inhibición con los controles positivos (trimetropim/sulfametoxazol 25 µg/disco y ciprofloxacino 5 µg/disco) y negativo (DMSO) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

## 9.6. Elaboración del gel base con el extracto vegetal

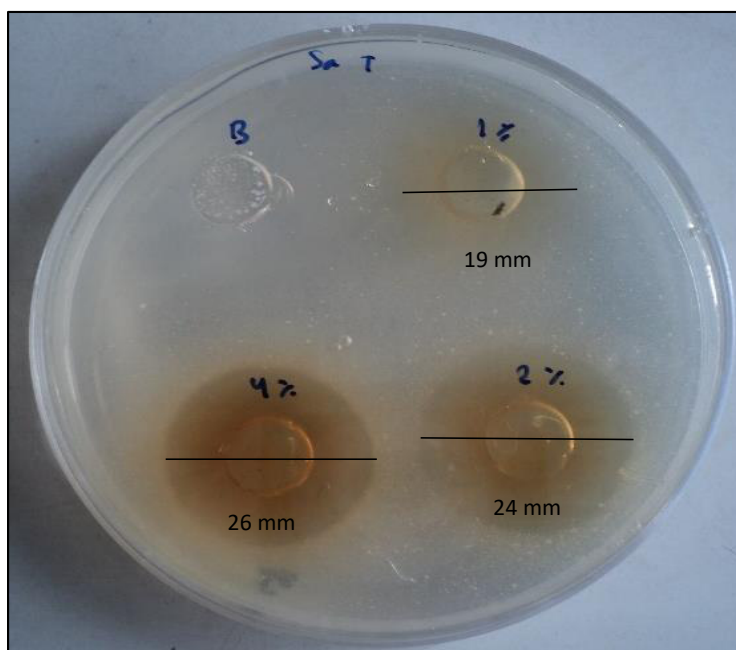


**Anexo 29.** Gel base

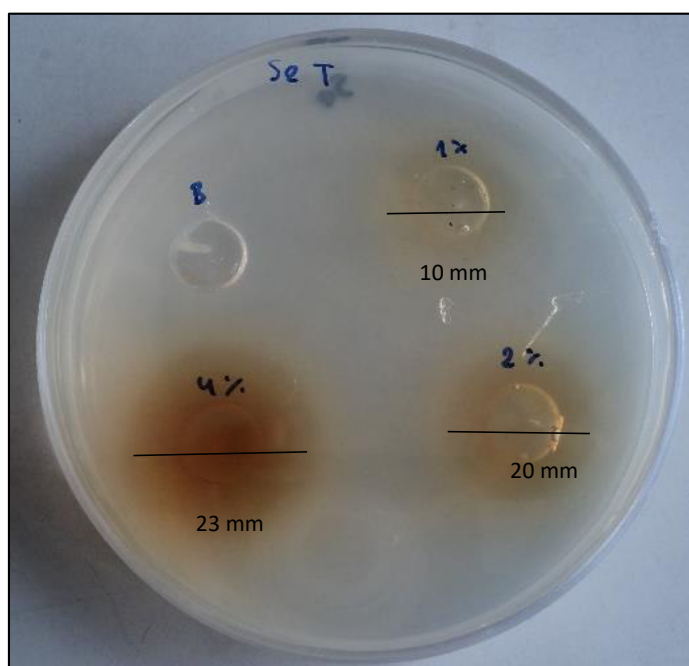


**Anexo 30.** Geles elaborados con el extracto

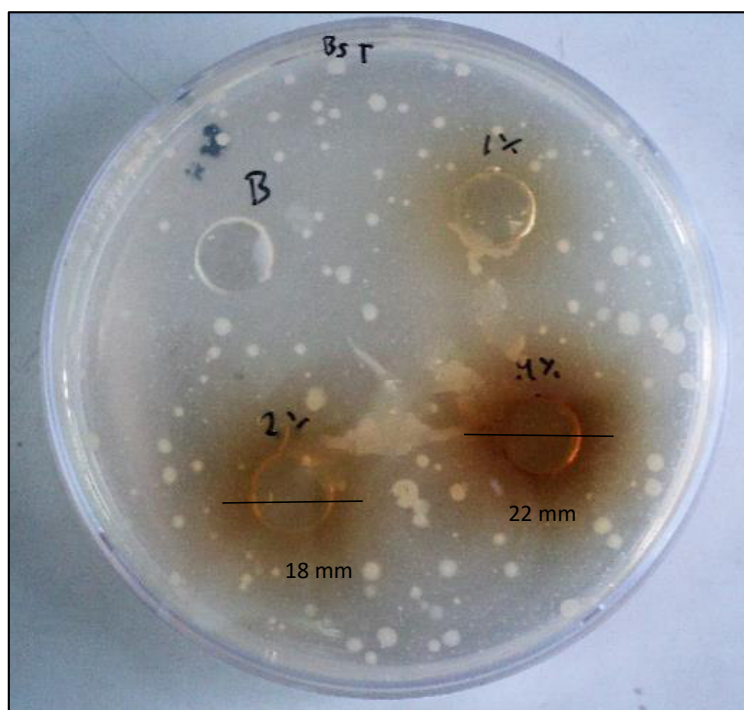
**9.7. Evaluación de la actividad antibacteriana del gel preparado con el extracto seco de tallo y hoja del *Marrubium vulgare* L.**



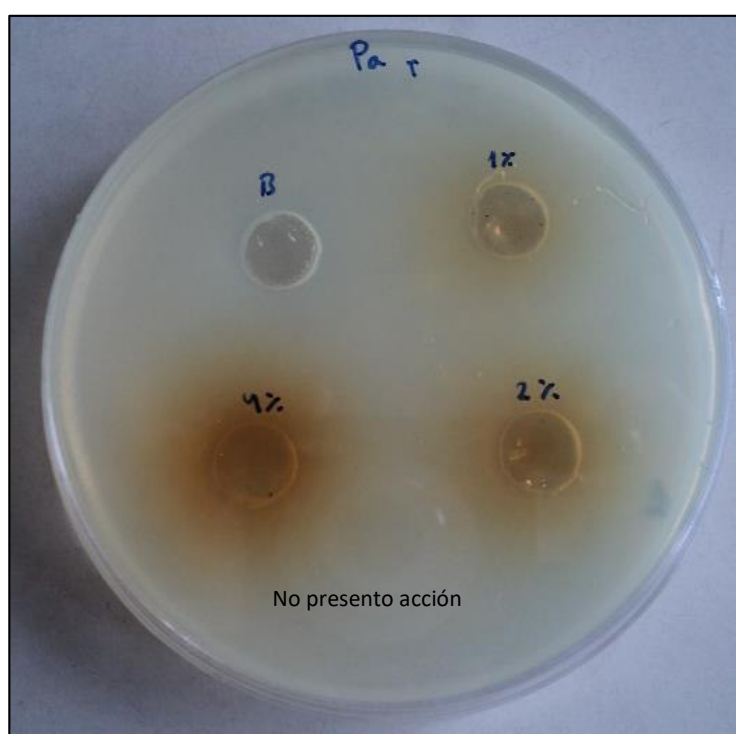
**Anexo 31.** Actividad antibacteriana del gel con el extracto seco del tallo del *Marrubium vulgare* L. al 1, 2 y 4 % frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



**Anexo 32.** Actividad antibacteriana del gel con el extracto seco del tallo del *Marrubium vulgare* L. al 1, 2 y 4 % frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.



**Anexo 33.** Actividad antibacteriana del gel con el extracto seco del tallo del *Marrubium vulgare* L. al 1, 2 y 4 % frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

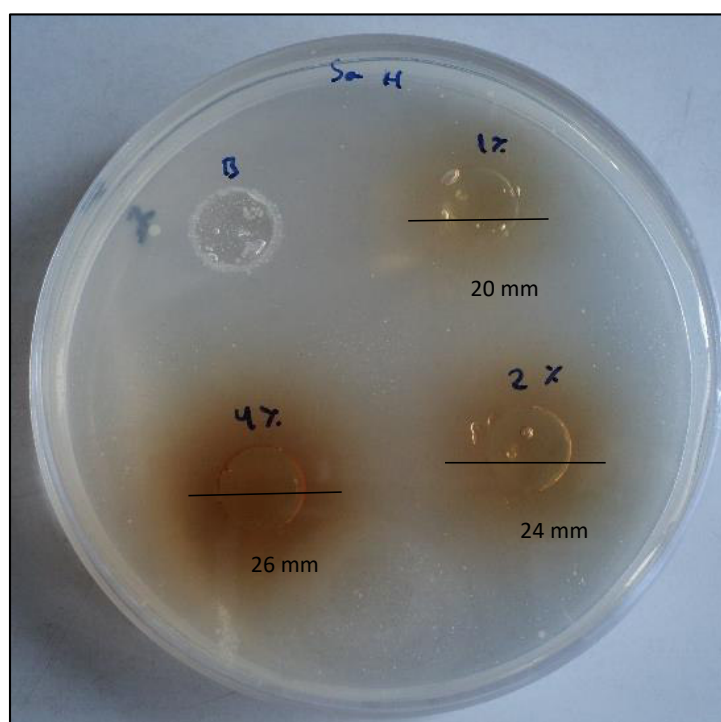


**Anexo 34.** Actividad antibacteriana del gel con el extracto seco del tallo del *Marrubium vulgare* L. al 1, 2 y 4 % frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

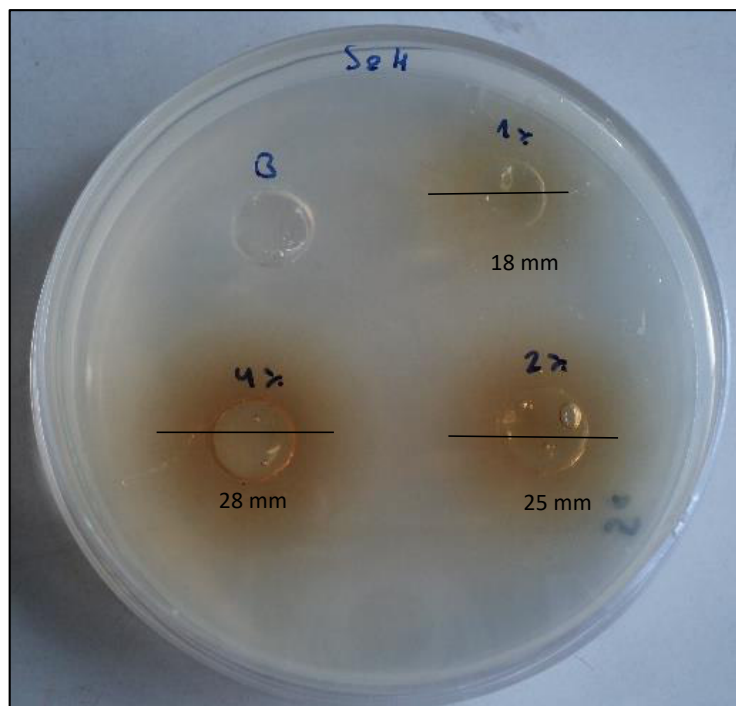




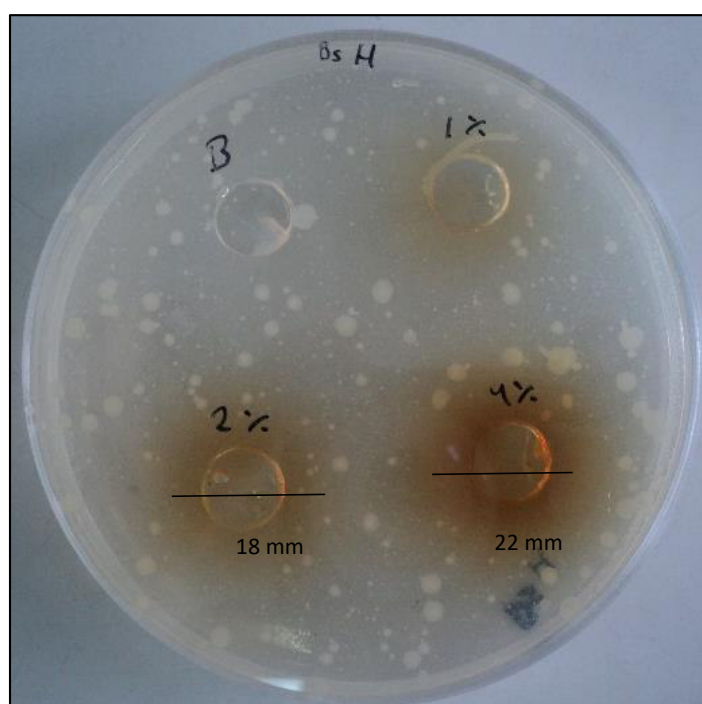
**Anexo 35.** Actividad antibacteriana del gel con el extracto seco del tallo del *Marrubium vulgare* L. al 1, 2 y 4 % frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.



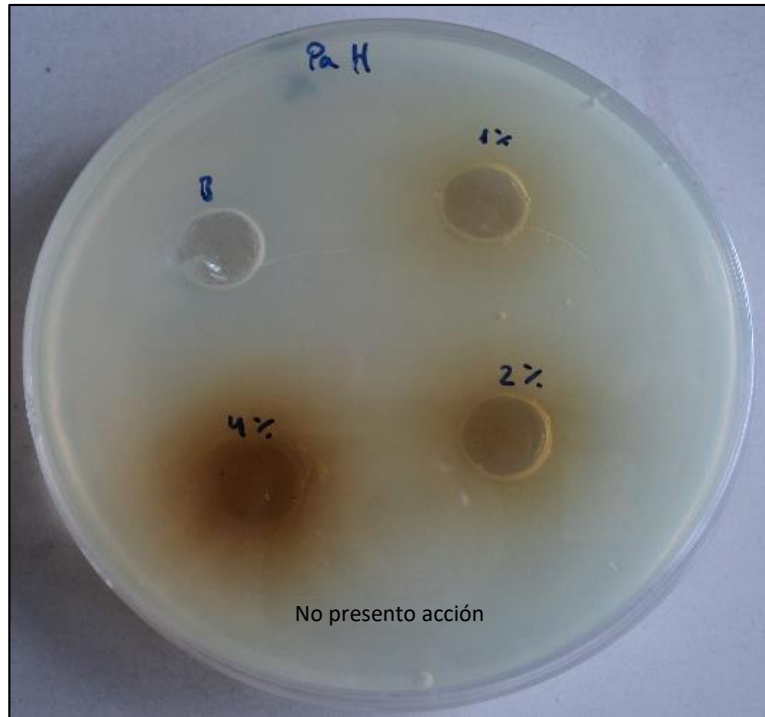
**Anexo 36.** Actividad antibacteriana del gel con el extracto seco de las hojas del *Marrubium vulgare* L. al 1, 2 y 4 % frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



**Anexo 37.** Actividad antibacteriana del gel con el extracto seco de las hojas del *Marrubium vulgare* L. al 1, 2 y 4 % frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.



**Anexo 38.** Actividad antibacteriana del gel con el extracto seco de las hojas del *Marrubium vulgare* L. al 1, 2 y 4 % frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633.



**Anexo 39.** Actividad antibacteriana del gel con el extracto seco de las hojas del *Marrubium vulgare* L. al 1, 2 y 4 % frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



**Anexo 40.** Actividad antibacteriana del gel con el extracto seco de las hojas del *Marrubium vulgare* L. al 1, 2 y 4 % frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.